



Recherche sur les précurseurs du 3-sulfanylhexanol des vins de Sauvignon blanc

Caroline Bocker

► To cite this version:

Caroline Bocker. Recherche sur les précurseurs du 3-sulfanylhexanol des vins de Sauvignon blanc. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0412 . tel-01249582

HAL Id: tel-01249582

<https://theses.hal.science/tel-01249582>

Submitted on 4 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE PRESENTEE POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Œnologie

Par Caroline BÖCKER

**RECHERCHES SUR LES PRÉCURSEURS DU
3-SULFANYLHEXANOL DES VINS DE SAUVIGNON BLANC**

Sous la direction du Pr Denis DUBOURDIEU

Soutenue le 15 décembre 2014

Membres du jury :

M. Philippe DARRIET	Professeur à l'Université de Bordeaux	Président
M. Roland RIESEN	Professeur à l'école de Changins, Suisse	Rapporteur
M. Ziya GUNATA	Professeur à l'Université de Montpellier	Rapporteur
Mme Cécile THIBON	Docteur, Ingénieur de Recherche à l'INRA	Examineur
Mme Virginie MOINE	Docteur, Directrice Scientifique, Biolaffort	Examineur
M. Denis DUBOURDIEU	Professeur à l'Université de Bordeaux	Directeur de thèse

Remerciements :

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Denis DUBOURDIEU, Directeur Général de l'Institut Scientifique de la Vigne et du Vin, pour m'avoir accueillie au sein de son Institut, mais également pour m'avoir confié ce sujet de thèse passionnant. Ses conseils avisés et précieux ont été décisifs dans l'obtention de ces résultats. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Je remercie également le Professeur Philippe DARRIET, directeur de l'unité de recherche œnologie, qui m'a accueillie au sein de son laboratoire et qui a accepté d'être président de mon jury de thèse. Merci à lui pour son accueil et sa bienveillance.

Je tiens aussi à remercier Luc LAFFORT pour le financement de cette thèse et la confiance qu'il m'a accordée pour la réalisation de celle-ci.

J'adresse également tous mes remerciements au Docteur Virginie Moine pour son soutien, sa disponibilité et sa gentillesse. Merci à elle d'avoir été présente tout au long de ces trois années de thèse.

Le Docteur Cécile Thibon m'a offert l'opportunité de réaliser cette thèse sur un sujet aussi complexe que passionnant. Grâce à son aide, particulièrement lors de la rédaction de cette thèse, j'ai pu mener à bien ce travail qui m'a été confié. Pour cela, je tiens à lui exprimer mes remerciements.

J'exprime toute ma gratitude aux membres du jury qui ont accepté d'examiner mon travail, Monsieur Ziya Gunata de l'Université de Montpellier et Monsieur Roland Riesen de l'Ecole de Changins en Suisse. Merci à eux pour leurs précieux conseils et pour leur implication dans ce projet.

J'exprime également mes remerciements à toutes celles et ceux qui m'ont apporté leur aide, notamment pour le dosage laborieux des thiols volatils ! Merci à Pascaline ainsi qu'à tous mes stagiaires : Julia, Chloé, Sébastien, Maxime et Julien.

Je remercie tout particulièrement Lucile Allamy pour son incroyable soutien, son amitié et tous les excellents moments passés en sa compagnie. Je lui passe le relai et lui souhaite tout le meilleur pour la suite !

J'adresse également tous mes remerciements à mes collègues et amis. Merci à vous d'avoir rendu plus douces ces trois années difficiles ! Petite mention spéciale à Axel, Blandine, Claire, Jacques, Lauriane, Lemia, Rakusa, Takis et Vincent.

Enfin, mes remerciements ne seraient pas complets sans exprimer toute ma reconnaissance à ma famille et à mes amis pour leur soutien quotidien, leur confiance, leurs encouragements et leur optimisme à toute épreuve !

Sommaire

LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES SCHEMAS	xvii

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIE	3
I. Thiols volatils	3
1) L'arôme du Sauvignon blanc	3
2) Réactivité des thiols volatils	5
II. Notion de précurseur d'arôme et révélation du potentiel en 3SH	6
1) Origine des thiols volatils : étude particulière des précurseurs du 3-sulfanylhéxanol (3SH).....	8
1.1) Précurseurs S-conjugués	8
1.1) Voies alternatives de formation du 3SH.....	11
2) Origine des S-conjugués au 3SH dans le raisin	11
3) Impact des différentes formes précurseurs sur la libération de 3SH.....	15
3.1) Teneurs en précurseurs et biotransformation par la levure	15
3.2) Etude de la libération de 3SH à partir de ses formes précurseurs.....	16
4) Révélation du potentiel en 3SH au cours de la fermentation alcoolique	16
4.1) Impact de la souche de levure et des conditions de fermentation alcoolique	16
4.2) Gènes impliqués dans la biotransformation des précurseurs du 3SH et dans la conversion en acétate de 3SH.....	18
III. Influence des paramètres de viticulture et de vinification sur la teneur en 3SH des vins de Sauvignon blanc.....	19
1) Viticulture	19
1.1) Influence des facteurs pédo-climatiques	19
1.2) Maturation des baies.....	19
2) Elaboration des moûts	20
3) Préservation des thiols volatils au cours de l'élevage du vin	20
3.1) Les antioxydants : le dioxyde de soufre	21
3.2) Les antioxydants : le glutathion.....	22

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES.....	23
I. Moûts et vins.....	23
II. Analyse des thiols volatils.....	23
1) Protocole de purification.....	23
2) Appareillage.....	24
3) Quantification des composés	25
4) Mesure colorimétrique de la concentration en thiols	25
III. Analyse des précurseurs du 3SH	26
1) Protocole de purification.....	26
2.1) Dans les moûts	26
2.2) Dans les vins	26
2) Appareillage.....	26
3) Conditions chromatographiques.....	28
4) Protocole de dérivation	28
IV. Analyses œnologiques courantes.....	28
1) Dioxyde de soufre libre	28
2) Sucres réducteurs et azote assimilable	29
V. Traitement des moûts au charbon actif	29
VI. Microvinifications	29
1) Milieu modèle de fermentation	29
2) Souche de levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
3) Contrôle des paramètres de fermentation	30
4) Dosage colorimétrique.....	30
5) Sulfitage et conservation des échantillons	31
6) Suivi des précurseurs au cours de la fermentation alcoolique	31
VII. Synthèse du Pgsh3SH-Al et Pgsh3SH-SO ₃	31
1) Synthèse du S-3-(hexan-1-al)-glutathion.....	31
2) Synthèse de l'acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique	31
VIII. Protocole de purification.....	33
1) Chromatographie en phase solide (<i>Solid-phase extraction</i> , ou SPE)	33
1.1) Protocole de purification sur résine.....	33
1.2) Préparation des fractions en vue de réaliser une fermentation alcoolique.	33
2) Chromatographie de partage centrifuge (CPC)	33
2.1) Appareillage.....	33

2.2) Paramètres d'analyse	35
2.3) Etude des fractions.....	35
2.4) Détermination des coefficients de partage (K_D).....	35
2.4.1) Coefficients de partage des précurseurs.....	35
2.4.2) Coefficients de partage du 3SH.....	31
3) Chromatographie Flash	31

PARTIE 1 : OPTIMISATION DES CONDITIONS DE PURIFICATION DES PRECURSEURS DU 3SH A

PARTIR DE MOUTS DE SAUVIGNON BLANC.....	31
---	----

CHAPITRE 3 : FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE BASSE PRESSION

I. Résultats préliminaires.....	32
II. Optimisation des conditions de fermentation	36
III. Optimisation du protocole de fractionnement du moût	45
1) Optimisation de la nature de l'adsorbant pour le fractionnement des moûts.....	45
2) Détermination de la capacité de charge maximum	49
3) Incidence de l'origine et de l'utilisation répétée de la résine	51
4) Optimisation du gradient d'élution.....	45
5) Contrôle de la répétabilité de la méthode	45
IV. Conclusion.....	56

CHAPITRE 4 : NOUVELLE APPROCHE DE PURIFICATION DES MOUTS PAR CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE (CPC)

I. Principe générale de la CPC.....	60
1) Notion de base	60
2) Choix du système de solvants	58
3) Avantages à l'utilisation de la CPC	58
II. Etude de la faisabilité de l'extraction des précurseurs par CPC.....	58
1) Extractibilité des précurseurs par différents solvants.....	58
2) Détermination du coefficient de partage du potentiel en 3SH des moûts.....	58
3) Extraction du potentiel en 3SH par CPC.....	58
III. Tentative de fractionnement du potentiel en 3SH des moûts par CPC	72
IV. Etude de l'impact de la matrice sur l'extraction du potentiel en 3SH.....	73
V. Développement d'un système de solvant adapté au fractionnement du potentiel en 3SH.....	72

1)	Etude de systèmes solvants obtenus par démixtion.....	72
1.1)	Impact de la nature du sel utilisé	72
1.2)	Détermination du coefficient de partage des précurseurs en fonction du système utilisé 72	
1.3)	Etude de l'influence de la concentration en sels	72
1.4)	Optimisation de la composition de la phase organique.....	72
2)	72
	Conclusions.....	72
VI.	Etude de la performance des solvants pontés dans la séparation des S-conjugués.....	72
1)	Nature des systèmes de solvants	72
2)	Détermination du coefficient de partage des précurseurs en condition modèle.....	86
3)	Impact du pH sur le coefficient de partage des précurseurs	86
4)	Adéquation des systèmes à la purification du potentiel en 3SH	86
4.1)	Compatibilité du système Butanol/Acétonitrile/Eau (BAE1,5)	86
4.2)	Compatibilité du système Butanol/Méthanol/Eau (BME).....	86
VII.	Utilisation de la CPC pour le fractionnement d'un extrait de moût obtenu par SPE-C ₁₈	86
1)	Fractionnement du potentiel en 3SH	86
2)	Optimisation du fractionnement.....	87
VIII.	Conclusion-Discussion	86

CHAPITRE 5 : CHROMATOGRAPHIE FLASH : AUTOMATISATION DU FRACTIONNEMENT SUR PHASE SOLIDE.....		86
I.	Développement de la technique de chromatographie Flash.....	86
II.	Préparation des moûts avant la chromatographie Flash	86
III.	Adaptation de la chromatographie Flash à la purification partielle des précurseurs du 3SH du moût 86	
1)	Etude des performances des colonnes PuriFlash IR C ₁₈	86
2)	Etude comparative de C ₁₈ de nature et d'origine différentes	87
3)	Synthèse des résultats et discussion	87
IV.	Application de la chromatographie Flash au fractionnement des précurseurs du 3SH du moût 89	
1)	Validation de la méthode à l'échelle préparative ; suivi des précurseurs Pcys3SH et Pgsh3SH au cours du fractionnement.....	89
2)	Vérification du seuil de saturation de la colonne.....	89
3)	Vérification du taux de récupération du potentiel en 3SH	91

4) Etude de la libération du 3SH au cours du fractionnement par chromatographie Flash	91
V. Conclusions.....	93

PARTIE 2, ETUDE ET IMPACT DES PRECURSEURS DU 3SH..... 95

CHAPITRE 6 : MISE EN EVIDENCE ET ETUDE DE DIFFERENTS COMPOSES PARTICIPANT AU POTENTIEL EN 3SH 97

I. Impact des composés insaturés en C ₆ dans la formation du 3SH	97
1) Corrélation entre la quantité en sulfure d'hydrogène introduite et la libération de 3SH	101
2) Etude de l'interaction entre le NaSH et le <i>trans</i> -2-hexenal et le <i>trans</i> -2-hexenol.....	103
3) Conclusion	105
II. Mise en évidence de nouvelles formes précurseurs du 3SH	107
1) Etude de la contribution au potentiel en 3SH d'un intermédiaire de réaction : le S-3-(hexan-1-al)-glutathion.....	107
1.1) Synthèse du S-3-(hexan-1-al)-glutathion.....	109
1.2) Identification et caractérisation du S-3-(hexan-1-al)-glutathion	111
1.2.1) Recherche par la masse exacte du S-3-(hexan-1-al)-glutathion dans le moût.....	111
1.2.2) Recherche du S-3-(hexan-1-al)-glutathion dans les fractions potentiellement précurseur du 3SH.....	113
1.3) Validation de son rôle de précurseur du 3SH.....	115
1.4) Mise au point d'une méthode de dosage	117
1.4.1) Développement de la méthode de dérivation du S-3-(hexan-1-al)-glutathion	119
1.4.2) Pré-purification du S-3-(hexan-1-al)-glutathion des moûts	121
1.4.3) Impact de la dérivation sur le dosage de l'ensemble des formes précurseurs du 3SH	123
1.4.4) Validation de la méthode de dosage du S-3-(hexan-1-al)-glutathion dans les moûts.....	123
1.4.4.1) Linéarité et courbe standard	125
1.4.4.2) Répétabilité , limite de quantification.....	125
1.4.4.3) Stabilité des échantillons avant analyse.....	127
1.5) Discussion	129
2) Etude de la contribution au potentiel en 3SH de l'acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique	131
2.1) Synthèse de l'acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique	133
2.2) Caractérisation de l'acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique en LC-MS	133
2.3) Confirmation de l'existence de l'acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique dans les moûts.....	135

2.4) Identification et quantification de l'acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique dans les fractions obtenues par chromatographie Flash.	137
2.5) Validation de son rôle de précurseur du 3SH	139
III. Applications : Dosage du Pgsh3SH-Al dans les moûts.....	139
III. Conclusions.....	141

CHAPITRE 7 : ETUDE DE LA CONTRIBUTION DES S-CONJUGUES DES MOÛTS AU POTENTIEL EN 3SH

I. Etude de la libération de 3SH suite à la fermentation des fractions partiellement purifiées.....	145
II. Confirmation de l'impact des formes S-conjugués	153
1) Fractionnement des précurseurs du 3SH à partir du moût 2013.....	153
2) Etude de la libération du 3SH suite à la fermentation des fractions pré-purifiées élargies ...	155
3) Etude de la libération du 3SH suite à la fermentation des fractions resserrées.....	157
III. Discussion et conclusion.....	159

CHAPITRE 8 : ASSIMILATION DES DIFFERENTS PRECURSEURS DES THIOLS VOLATILS DES VINS DE SAUVIGNON BLANC AU COURS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

I. Suivi des précurseurs du 3SH au cours de la fermentation alcoolique en milieu modèle	167
1) Cinétique fermentaire	167
2) Suivi de l'assimilation des précurseurs du 3SH en milieu modèle de fermentation	169
2.1) Assimilation du Pcys3SH au cours de la fermentation	169
2.2) Assimilation du Pgsh3SH au cours de la fermentation	169
2.3) Assimilation des formes libres et combinées du Pgsh3SH-Al au cours de la fermentation	173
3) Implication des formes S-conjuguées dipeptidiques	175
4) Conclusions	177
II. Impact du SO ₂ sur la biotransformation des précurseurs en 3SH	179
1) Impact du SO ₂ sur la libération de 3SH en fin de fermentation	181
2) Evolution des S-conjugués au cours de la fermentation alcoolique	181
III. Pourcentages de transformation des précurseurs en 3SH au cours de la fermentation alcoolique	185
IV. Etude de la contribution des précurseurs à la formation de l'acétate de 3SH au cours de la fermentation	187
V. Cinétique d'assimilation des précurseurs par la levure au cours de la fermentation alcoolique d'un moût de Sauvignon blanc.....	189

IV. Conclusion	191
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	197
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	207

Liste des abréviations

Abréviations courantes	
4MSP	4-Methyl-4-sulfanylpentan-2-one
3SH	3-Sulfanylhexanol
A3SH	3-Sulfanylhexyl acetate
CPC	Chromatographie de partage centrifuge
CPPA	Composé potentiellement précurseur d'arôme
FA	Fermentation alcoolique
FNR	Fraction non retenue
FPPA	Fraction potentiellement précurseur d'arôme
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée a la spectrométrie de masse
HPLC-MS	Chromatographie liquide haute performance couplée a la spectrométrie de masse
K _D	Coefficient de partage
Lav	Fraction de lavage
MM	Milieu modèle
PAS	Précurseur de l'arôme du Sauvignon
Pcys3SH	S-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine
Pcysgly3SH	S-conjugué à la cystéinyl-glycine
Pglucys3SH	S-conjugué à la γ -glutamylcystéine
Pgsh3SH	S-3-(hexan-1-ol)-glutathion
Pgsh3SH-Al	S-3-(hexan-1-al)-glutathion
Pgsh3SH-D3	d ₃ -S-3-(hexan-1-al)-glutathion
Pgsh3SH-SO ₃	acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique
SPE	Extraction en phase solide

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Dosage des précurseurs cystéinylés (A) et glutathionylés (B) dans les fractions obtenues par percolation du moût sur ENVI-18 (5g). Chaque palier d'élution correspond à une fraction matérialisée par son pourcentage de méthanol (n=2)	33
Figure 2 : Dosage du 3SH libéré après fermentation du moût témoin ou des fractions obtenues après percolation du moût sur ENVI-18 (5g). Chaque palier d'élution correspond à une fraction matérialisée par son pourcentage de méthanol. FNR : fraction non retenue (n=2).....	33
Figure 3 : Cinétique de fermentation en fonction de la teneur initiale en sucre du milieu modèle (210 g/L, 160g/L, 130g/L et 100g/L de sucres)	37
Figure 4 : Libération de 3SH après fermentation alcoolique en milieu modèle contenant 210g/L, 160g/L, 130g/L et 100g/L de sucres.....	37
Figure 5 : Dosage des précurseurs cystéinylés (A) et glutathionylés (B) dans les fractions obtenues par percolation du moût sur XAD-2, XAD-4 ou C18. Témoin : moût témoin non percolé. FNR1 : fraction non retenue correspondant à 1,5 mL de moût percolé par gramme d'adsorbant. FNR2 : fraction non retenue correspondant à 1,5 mL de moût supplémentaire percolé par gramme d'adsorbant. Lavage, Elu 50% et Elu 100% correspondent à chaque palier d'élution collecté (n=2)	46
Figure 6 : Dosage du 3SH libéré après fermentation des fractions obtenues par percolation du moût sur XAD-2, XAD-4 ou C18. Témoin : moût témoin non percolé. FNR1 : fraction non retenue correspondant à 1,5 mL de moût percolé par gramme d'adsorbant. FNR2 : fraction non retenue correspondant à 1,5 mL de moût supplémentaire percolé par gramme d'adsorbant. Lavage, Elu 50% et Elu 100% correspondent à chaque palier d'élution collecté (n=2)	46
Figure 7 : Dosage des précurseurs cystéinylés (A) et glutathionylés (B) dans les fractions obtenues par percolation du moût sur C18. Témoin : moût témoin non percolé. FNR1 : fraction non retenue correspondant à 3 mL de moût percolé par gramme d'adsorbant. FNR2 : fraction non retenue correspondant à 3 mL de moût supplémentaire percolé par gramme d'adsorbant. Lavage, Elu 1%, Elu 50% et Elu 100% correspondent à chaque palier d'élution collecté (n=2)	48
Figure 8 : Dosage du 3SH libéré après fermentation des fractions obtenues par percolation du moût sur C18. Témoin : moût témoin non percolé. FNR1 : fraction non retenue correspondant à 1,5 mL de moût percolé par gramme d'adsorbant. FNR2 : fraction non retenue correspondant à 1,5 mL de moût supplémentaire percolé par gramme d'adsorbant. Lavage, Elu 50% et Elu 100% correspondent à chaque palier d'élution collecté (n=2)	51
Figure 9 : Dosage des précurseurs cystéinylés (A) et glutathionylés (B) dans les fractions obtenues par percolation du moût sur C18. Témoin : moût témoin non percolé. FNR : fraction non retenue correspondant à 3 mL de moût percolé par gramme d'adsorbant. Lavage, Elu 1%, Elu 30 % et Elu 100% correspondent à chaque palier d'élution collecté (n=2)	46
Figure 10 : Dosage du 3SH libéré après fermentation des fractions obtenues par percolation du moût sur C18. Témoin : moût témoin non percolé. FNR : fraction non retenue correspondant à 3 mL de moût percolé par gramme d'adsorbant. Lavage, Elu 1%, Elu 30 % et Elu 100% correspondent à chaque palier d'élution collecté (n=2).....	46
Figure 11 : Schéma descriptif d'un 'appareil de chromatographie de partage centrifuge (CPC) (d'après Toribio, 2007)	58
Figure 12 : Schéma d'une chaîne de CPC (d'après Toribio, 2007)	59
Figure 13 : Localisation et quantification des sucres et formes précurseurs du 3SH dans les fractions issues de l'extraction d'un moût (10mL) au butanol (10/10/10).....	59
Figure 14 : Localisation et quantification des sucres et formes précurseurs du 3SH dans les fractions issues de l'extraction d'un moût (10mL) à l'acétate d'éthyle (10/10/10)	59

Figure 15 : Dosage du 3SH libéré « dans » chacune des phases obtenues après extraction. Phase A= libération de 3SH après fermentation alcoolique en milieu modèle de la phase aqueuse ; phase B= libération de 3SH après fermentation alcoolique en milieu modèle de la phase butanolique ; phase A+B= libération de 3SH après fermentation alcoolique en milieu modèle de la reconstitution des phases avant fermentation (n=2)	59
Figure 16 : 3SH libéré après fermentation des regroupements des fractions collectées après CPC. Les regroupements 1-5 et 6-15 correspondent à chacun un volume de moût élué. 16-20 correspond au lavage à l'eau. 21-23 correspond à l'extrusion butanolique (n=2)	59
Figure 17 : Teneur en Pcys3SH et Pgsh3SH avant fermentation dans les regroupements de fraction CPC. Les regroupements 1-5 et 6-15 correspondent à chacun un volume de moût élué. 16-20 correspond au lavage à l'eau. 21-23 correspond à l'extrusion butanolique (n=2)	73
Figure 18 : Libération des arômes (3SH) après fermentation en milieu modèle des regroupements de fraction CPC. Le regroupement 1-20 correspond au volume de moût percolé. 11-23, 24-26 et 37-50 correspondent au gradient d'élution. 51-58 et 59-69 correspondent à l'élution au butanol. 70-128 correspond à l'extrusion (n=2)	73
Figure 19 : Analyses des précurseurs connus du 3SH avant fermentation dans les regroupements de fraction CPC. Le regroupement 1-20 correspond au volume de moût percolé. 11-23, 24-26 et 37-50 correspondent au gradient d'élution. 51-58 et 59-69 correspondent à l'élution au butanol. 70-128 correspond à l'extrusion (n=2)	73
Figure 20 : Dosage des précurseurs cystéinylés et glutathionylés (µg/L) dans les tubes récupérés en sortie de CPC. Les tubes 1 à 110 correspondent à la phase d'élution aqueuse, récupérée en sortie de CPC. Les tubes 120 à 160 correspondent à la phase d'extrusion butanolique récupérée en sortie de CPC	86
Figure 21 : Dosage du 3SH libéré après fermentation en milieu modèle des regroupements des fractions obtenues par CPC. Les regroupements 1-14, 15-50, 41-66, 67-93 et 94-120 correspondent à la phase d'élution aqueuse. Le regroupement 121-160 correspond à la phase d'extrusion butanolique (n=2)	87
Figure 22 : Dosage des précurseurs cystéinylés et glutathionylés (Pcys3SH et Pgsh3SH) en µg/L, tous les 5 tubes collectés en sortie de CPC	87
Figure 23 : Dosage du 3SH libéré (ng/L) après fermentation de chaque regroupement des fractions collectées en CPC (n=2)	87
Figure 24 : Comparatif des valeurs obtenues en 3SH après fermentation d'un moût ou de fraction obtenue par C18-SPE de ce même moût, traité ou non au charbon actif. Moût : moût témoin non percolé. Elu30% : fraction d'élution à 30% de méthanol. Elu 100% : fraction d'élution à 100% de méthanol. - : échantillon non traité. + : échantillon traité au charbon actif (n=2)	87
Figure 25 : Répartition des précurseurs cystéinylés (Pcys3SH, en A) et glutathionylés (Pgsh3SH, en B) dans les différentes fractions de chromatographie Flash sur PuriFlash IR C18 20g. FNR : fraction non retenue. Lav : lavage à l'eau. % de méthanol au cours du gradient d'élution	86
Figure 26 : Analyse des formes précurseurs dans les fractions collectées (A, B et C) et du 3SH correspondant après fermentation (D, E et F) selon la colonne utilisée en chromatographie Flash. A et D correspondent à la percolation de 150 mL de moût sur PF30 C18 aQ-35g (4,3mL/g ; collecte par tube de 25mL), B et E correspondent à la percolation de 40 mL de moût sur Chromabond Flash RS4 C18ec-4g (10mL/g ; collecte par tube de 10 mL) et C et F correspondent à la percolation de 150 mL de moût sur Chromabond Flash RS4 C18ec (37mL/g ; collecte par tube de 10 mL)	87
Figure 27 : Répartition des formes précurseurs cystéinylées et glutathionylées dans les différentes fractions obtenues par percolation de 5L de moût en chromatographie Flash sur RS330. L'analyse est réalisée tous les 5 tubes. FNR : fraction non retenue. Lav : lavage à l'eau. % : pourcentage de méthanol lors de l'élution	88
Figure 28 : Teneur en 3SH libéré après fermentation alcoolique des fractions non retenues (exprimée en % de libération par rapport au témoin (100%)). Pour plus de lisibilité le témoin n'est pas représenté sur le graphique. Chaque FNR correspond à 1L de moût percolé	90

Figure 29 : Teneur en 3SH libéré après fermentation de la fraction non retenue (FNR) et d'une reconstitution du moût après fractionnement obtenue par supplémentation de la FNR par les fractions retenues (FNR+FR), exprimée en pourcentage de libération par rapport au témoin (100%) ...	90
Figure 30 : Teneur en 3SH libéré après fermentation des fractions obtenues par chromatographie Flash sur RS330, exprimée en pourcentage de libération par rapport au témoin (100%)	92
Figure 31 : Libération de 3SH après fermentation d'un moût additionné de NaSH (0,1mM, 1mM, 10mM) avant fermentation ou 48h après ensemencement (n=2)	100
Figure 32 : Chromatogramme en LC-MS des ions totaux du Pgsh3SH-Al de synthèse (gamme de masse enregistrée 80-1000uma).....	110
Figure 33 : Spectre de masse du Pgsh3SH-Al de synthèse en mode positif.....	110
Figure 34 : Chromatogrammes de l'ion à m/z 406,1642 obtenus en LC-MS à partir du Pgsh3SH-Al de synthèse (A) et à partir d'un extrait de moût de Sauvignon blanc (B); colonne analytique : Synchronis C ₁₈ Aq, 100 x 2,1mm ; 1,7µm (Thermo Scientific).....	112
Figure 35 : Analyse des précurseurs cystéinylés (Pcys3SH) et glutathionylés (Pgsh3SH) obtenus en sortie de chromatographie Flash (A), corrélé à la détection du Pgsh3SH-Al exprimé en équivalent Pgsh3SH (B)	114
Figure 36 : Exemple d'un profil chromatographique LC-MS de l'ion m/z à 406 du Pgsh3SH-Al de synthèse	116
Figure 37: Cinétique de formation des dérivés du Pgsh3SH-Al (Pgsh3SH-DNPH et Pgsh3SH-HA) au cours du temps. La flèche correspond à l'ajout du réactif de dérivation. A : dérivation par la DNPH solubilisée dans l'acétonitrile. B : dérivation par l'HA, à température ambiante. C : dérivation par l'HA, à 60°C (méthanol/eau).....	118
Figure 38 : Dosage des formes Pgsh3SH-Al et Pgsh3SH-Al-HA (A) ainsi que des formes Pcys3SH et Pgsh3SH (B) selon si l'échantillon est dérivé ou non et selon la température et la durée de conservation de l'échantillon avant injection (n=2)	126
Figure 39: Teneur en Pgsh3SH-Al (exprimée par le ratio des aires du pic du Pgsh3SH-Al sur celui de l'étalon interne, EI) dans un extrait de moût dopé ou non, conservé 3 heures à 60°C	128
Figure 40 : Chromatogramme de l'ion à m/z 488 obtenus en LC-MS (méthode chromatographique) du Pgsh3SH-SO ₃ de synthèse (A) et du Pgsh3SH-SO ₃ dans un extrait de moût (B).....	132
Figure 41 : Spectre de masse en mode positif des 4 pics (2,7min, 2,83min, 3min et 3,17min) du Pgsh3SH-SO ₃ de synthèse.....	132
Figure 42 : Estimation de l'abondance du signal de l'ion à m/z 488 associé à la présence du Pgsh3SH-Al sous forme bisulfite (exprimée par le ratio des aires du pic d'intérêt sur celui de l'étalon interne, EI) lors de l'incubation des extraits de moûts à 60°C. Le même échantillon est donc réinjecté à 30, 60, 115, et 200 minutes.....	134
Figure 43 : Dosages des Pgsh3SH-Al et Pgsh3SH-SO ₃ dans les fractions obtenues par chromatographie Flash.....	136
Figure 44 : Dosage des précurseurs cystéinylés (A), glutathionylés (B), et glutathionylés sous forme aldéhydique libre et combinée (C), dans les tubes obtenus en sortie de chromatographie Flash. Les fractions resserrées sont matérialisées par des pointillés. Concentration en 3SH libérée (D) après fermentation des regroupements (n=2) (moût Bordeaux 2011)	146
Figure 45 : Dosage des précurseurs glutathionylés sous forme aldéhyde libre et combinée (A), cystéinylés (B) et glutathionylés (C) dans les fractions « élargies » et « resserrées » (n=1), associé à la libération de 3SH en fin de fermentation alcoolique (D, E et F) (n=2)	148
Figure 46 : Dosage des précurseurs glutathionylés sous forme aldéhyde libre et combinée (A), cystéinylés et glutathionylés (B), dans les tubes obtenus en sortie de chromatographie Flash (moût Bordeaux 2013). Les fractions resserrées sont indiquées par les zones grisées.....	152
Figure 47 : Dosage de l'ensemble des formes précurseurs dans les fractions obtenues en sortie de chromatographie Flash (A) (n=1), corrélé à la libération de 3SH en fin de fermentation (B), (n=2). (1-255) correspond au regroupement de l'ensemble des tubes	154

Figure 48 : Dosage des précurseurs glutathionylés sous forme aldéhyde libre et combinée (A), cystéinylés (B) et glutathionylés (C) dans les fractions « élargies » et « resserrées » (n=1), associé à leur libération de 3SH en fin de fermentation alcoolique (D, E et F) (n=2).....	156
Figure 49 : Cinétique fermentaire présentant le dégagement de CO ₂ (g/L) en fonction du temps écoulé après ensemencement. Les étoiles correspondent aux prélèvements effectués en vue de l'analyse des précurseurs. La flèche (→) indique le début de la fermentation alcoolique (premières bulles).....	166
Figure 50 : Cinétique d'assimilation des précurseurs au cours de la fermentation alcoolique d'un milieu modèle additionné en Pcys3SH à 100 µg/L. La flèche (→) indique le début de la fermentation alcoolique (premières bulles) (n=2)	168
Figure 51 : (A) Cinétique d'assimilation des précurseurs au cours de la fermentation alcoolique d'un milieu modèle additionné en Pgsh3SH à 600 µg/L. La flèche (→) indique le début de la fermentation alcoolique (premières bulles) (n=2). (B) corrélation entre la teneur en Pgsh3SH consommé et la teneur en Pcys3SH libéré au cours de la phase de consommation du Pgsh3SH (0-20h)	170
Figure 52 : Suivi de la teneur en précurseurs au cours de la fermentation alcoolique d'un milieu modèle additionné de 600µg/L de Pgsh3SH-Al sous forme libre (A) ou combinée (B), dans un milieu modèle. La flèche (→) indique le début de la fermentation alcoolique (premières bulles) (n=2)	172
Figure 53 : Dosage composés intermédiaires Pglucys3SH et Pcysgly3SH au cours de la fermentation alcoolique, après supplémentation en Pcys3SH (A), en Pgsh3SH (B) et en Pgsh3SH-Al (C) issus de synthèse chimique (n=2). La flèche (→) indique le début de la fermentation alcoolique (premières bulles).....	174
Figure 54 : Dosage du 3SH libéré (ng/L) en fin de fermentation alcoolique, après supplémentation du milieu modèle en S-conjugués (1µM) ou en trans-2-hexenal (Hex ; 5µM) et glutathion (GSH) en absence (Ø SO ₂) ou en présence (+SO ₂) de 20 mg/L d'anhydride sulfureux. (n=2)	180
Figure 55 : Cinétique d'assimilation des précurseurs au cours de la fermentation alcoolique d'un milieu modèle additionné de Pgsh3SH-SO ₃ en présence de SO ₂ (20mg/L). La flèche (→) indique le début de la fermentation alcoolique (premières bulles) (n=2)	180
Figure 56 : Evolution des S-conjugués au cours du temps en milieu modèle additionné de <i>trans</i> -2-hexenal (5µM) et de glutathion ensemencé par <i>S. cerevisiae</i> (Souche X5) ou conservé en conditions identiques et stériles en présence (B et D) ou en absence (A et C) de SO ₂ . Ne sont détectés que le Pgsh3SH-Al (A et B) et le Pcys3SH (C et D). La flèche (→) indique le début de la fermentation alcoolique (premières bulles) (n=2)	182
Figure 57 : Assimilation des formes précurseurs (Pcys3SH, Pgsh3SH et Pgsh3SH-SO ₃) au cours de la fermentation alcoolique (A) d'un moût de Sauvignon blanc (2012). B montre les mêmes données pour les premières heures de fermentation. La flèche (→) indique le début de la fermentation alcoolique (premières bulles) (n=2)	188
Figure 58 : Voie proposée d'assimilation des formes précurseurs par la levure au cours de la fermentation alcoolique et flux métabolique conduisant à la libération de 3SH dans les vins..	190

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Structure et descripteurs des principaux thiols volatils « variétaux » identifiés dans les vins de Sauvignon blanc et incidence organoleptique	4
Tableau 2 : Structure des précurseurs et intermédiaires de réaction S-conjugués du 3SH.....	7
Tableau 3 : Méthodes d'analyse et de quantification des précurseurs cystéinylés et glutathionylés dans les moûts.....	12
Tableau 4 : Synthèse bibliographique des concentrations et pourcentages de bioconversion des précurseurs cystéinylés et glutathionylés	14
Tableau 5 : Conditions d'analyse des dosages de précurseurs du 3SH par HPLC-MS. Voie A = eau + 0,1% HCOOH. Voie B = acétonitrile + 0,1% HCOOH	28
Tableau 6 : Références des différentes résines utilisées en SPE.....	32
Tableau 7 : Méthode d'analyse du fractionnement des S-conjugués du 3SH, par chromatographie de partage centrifuge. La voie A correspond à la phase aqueuse tandis que la voie B correspond à la phase organique	35
Tableau 8 : Références des différentes résines de chromatographie Flash	31
Tableau 9 : Méthode d'analyse du fractionnement de 5L de moût par chromatographie Flash	31
Tableau 10 : Teneur relative en 3SH libéré après fermentation alcoolique des fractions d'élution. 100% correspond à la teneur moyenne du témoin non percolé	51
Tableau 11 : Fractionnement des précurseurs de 3SH d'un moût de Sauvignon par chromatographie sur SPE C ₁₈ . Teneurs en Pcys3SH et Pgsh3SH dans les fractions séparées (en % de leur teneur dans le moût). Teneurs en 3SH libéré après fermentation alcoolique par les fractions séparées (en % de la teneur en 3SH du moût fermenté). FNR : Fractions non retenues. 1% correspond à une élution à 1% de méthanol. 100% correspond à une élution à 100% de méthanol.....	56
Tableau 12 : Conditions CPC lors de l'extraction de 125mL de moût sur la colonne de 100mL.....	59
Tableau 13 : Conditions CPC pour le fractionnement du potentiel en 3SH par injection directe du moût (volume de moût injecté = 150mL) et pourcentage des phases en cours d'analyse. A, B, C et D correspondent respectivement à l'eau saturée en butanol, le moût saturé en butanol, le mélange acétate d'éthyle-butanol-eau (60-30-10) et le butanol saturé en eau.....	72
Tableau 14 : Impact de la teneur en sucres (glucose + fructose) de la phase aqueuse du système butanol-eau sur le partage du Pcys3SH et du Pgsh3SH. Avec $K_D = (C_{aq}) / (C_{org})$	73
Tableau 15 : Nombre de phases observées et stabilité du système solvant lors la démixtion du solvant et de l'eau par le sulfate d'ammonium	73
Tableau 16 : Coefficients de partage calculés des précurseurs cystéinylés et glutathionylés pour chaque système de solvant testé. Il correspond au ratio de la concentration de la phase aqueuse sur celle de la phase organique. Un K_D supérieur à 100 indique que plus de 99% des composés sont contenus dans la phase aqueuse (n=2)	73
Tableau 17 : Calcul des coefficients de partage des précurseurs cystéinylés et glutathionylés dans le système isopropanol-eau, selon la saturation en sels	73
Tableau 18 : Calcul des coefficients de partage des précurseurs cystéinylés et glutathionylés pour chaque système de solvant testé, selon la composition de la phase organique (isopropanol ou acétonitrile) (n=2).....	73
Tableau 19 : Répartition du volume des phases en fonction des combinaisons de solvant testées et temps de séparation des phases après agitation. Les cases grisées correspondent à des combinaisons de solvants sélectionnés pour la suite de l'étude	86

Tableau 20 : Calcul des coefficients de partage des précurseurs cystéinylés et glutathionylés pour chaque système et chaque proportion de solvants testés. Avec $K_D = (Caqu.) / (C\ org.)$ Les cases grisées correspondent à des résultats satisfaisants.....	86
Tableau 21 : Calcul des coefficients de partage (K_D) des précurseurs cystéinylés et glutathionylés pour le système butanol, acétonitrile et eau, en proportions 5/1,5/5, selon le pH. Avec $K_D = (Caqu.) / (C\ org.)$	87
Tableau 22 : Calcul des coefficients de partage (K_D) des précurseurs cystéinylés, glutathionylés et du 3SH libéré après fermentation de ces fractions. La fraction Elu1% ne contient pas de formes précurseurs connues au départ et Elu 30% renferme l'ensemble des précurseurs connus. Avec $K_D =$ rapport des concentrations de la phase aqueuse sur celle de la phase organique. Avec $K_D = (Caqu.) / (C\ org.)$	87
Tableau 23 : Coefficients de partage (K_D) des précurseurs cystéinylés et glutathionylés pour chaque système de solvant testé. Avec $K_D = (Caqu.) / (C\ org.)$	87
Tableau 24 : Condition CPC pour le fractionnement d'un extrait de moût, équivalent à 400mL, avec le système butanol/ méthanol / eau, à pH=2,2 (BME2,5)	86
Tableau 25 : Conditions de la purification de 150 mM de moût traité au charbon en chromatographie Flash sur PuriFlash IR C ₁₈ 20g (7,5 mL/g de silice C ₁₈)	86
Tableau 26 : Récapitulatif des rendements de récupération pour chaque C ₁₈ testée. Le pourcentage de 3SH non attribué aux formes connues est également précisé sous le terme FPPA (pour fraction potentiellement précurseur d'arômes)	87
Tableau 27 : Protocole de fractionnement par chromatographie Flash de 5L de moût.....	88
Tableau 28 : Libération du 3SH après fermentation alcoolique ou après 72 heures à 24°C. Chaque modalité est complétée avec 1mM de NaSH (soit 10 000 fois la teneur maximum en H ₂ S par les levures œnologiques). Les essais 1 à 3 sont réalisés soit à partir de la matrice moût et les essais 4 à 6 en milieu modèle (MM)(n=2). Nd : non détecté.....	102
Tableau 29 : Etude de l'effet de l'addition conjointe du NaSH (1mM, 10 000X) et des composés en C ₆ . Les tests sont réalisés sur du moût de Sauvignon blanc complété en <i>trans</i> -2-hexenal (1mM, 2000X) ou <i>trans</i> -2-hexenol (1mM, 1000X) (n=2)	104
Tableau 30 : Taux de conversion du <i>trans</i> -2-hexenal et du <i>trans</i> -2-hexenol en 3SH	104
Tableau 31 : Teneur en 3SH libéré à partir du Pgsh3SH-Al (500 µg/L) additionné en milieu modèle au cours de la fermentation alcoolique et estimation de son taux de biotransformation en 3SH (%)	114
Tableau 32 : Influence de la quantité d'HA utilisé sur rendement de dérivation du Pgsh3SH-Al.....	120
Tableau 33 : Estimation du rendement d'extraction du Pgsh3SH-Al (exprimé en unité arbitraire) lors de la purification à partir de 1 mL de moût.....	120
Tableau 34 : Impact de la dérivation sur le dosage du Pcys3SH, du Pgsh3SH et du Pgsh3SH-Al. La moyenne et l'écart-type des 5 répétitions sont également indiqués	122
Tableau 35 : Récapitulatif des validations de la méthode de dosage du S-3-(hexan-1-al)-glutathion et des autres composés précurseurs.....	124
Tableau 36 : Rendement de la réaction d'addition du SO ₂ sur le S-3-(hexan-1-al)-glutathion.....	130
Tableau 37 : Teneur en 3SH libéré à partir du Pgsh3SH-SO ₃ (1mM) additionné en milieu modèle au cours de la fermentation alcoolique et estimation de son taux de biotransformation en 3SH (%)	138
Tableau 38 : Concentrations en précurseurs cystéinylés (Pcys3SH), glutathionylés (Pgsh3SH) et glutathionylés sous forme aldéhydique libre ou combinée (Pgsh3SH-Al total) dans les moûts de Bordeaux et Sancerre des millésimes 2011 à 2013. (n) correspond au nombre d'échantillons analysés.....	138
Tableau 39 : Teneurs en précurseurs (Pcys3SH, Pgsh3SH, Pgsh3SH-Al et Pgsh3SH-SO ₃) des fractions obtenues par chromatographie Flash à partir de 5L de moût (Bordeaux, 2011)	144
Tableau 40 : Estimation du degré de pureté des fractions 29-31 (Pgsh3SH-Al total), 55-57 (Pcys3SH) et 65-67 (Pgsh3SH) par analyse du chromatogramme des ions totaux sur la gamme de masse de m/z 100 à 1000 (LC-MS)	148

Tableau 41 : Estimation du taux de participation des trois formes précurseurs au potentiel en 3SH des moûts (%)	150
Tableau 42 : Estimation du taux de participation des trois formes précurseurs au potentiel en 3SH du moût 2013 (%)	156
Tableau 43 : Pourcentages de biotransformation des formes précurseurs de synthèse en 3SH au cours de la fermentation alcoolique en fonction de la dose initiale de SO ₂ . La moyenne et l'erreur type sont calculées à partir des données obtenues sur l'ensemble des essais effectués	184
Tableau 44 : Taux de conversion du 3SH en A3SH, selon la forme précurseur supplémentée et selon la concentration en SO ₂ du milieu (n=2)	186

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1 : Equilibre réactionnel du SO ₂ en solution aqueuse	21
Schéma 2 : Structure du S-3-(hexan-1-al)-glutathion (composé potentiellement précurseur d'arôme, Pgsh3SH-Al), réduit en S-3-(hexan-1-ol)-glutathion (Pgsh3SH)	108
Schéma 3 : Synthèse du S-3-(hexan-1-al)-glutathion	108
Schéma 4: Mécanisme de réduction des aldéhydes en acides α-hydroxysulfoniques.....	130
Schéma 5 : Formule semi-développée de l'acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique (Pgsh3SH-SO ₃)	130
Schéma 6: Schéma de conversion des précurseurs cystéinylés et glutathionylés en 3SH et A3SH. Les flèches pleines correspondent à des étapes validées, alors que les flèches en pointillés sont encore hypothétique (d'après Winter <i>et al.</i> , 2011). (1) Subileau <i>et al.</i> , 2008b ; (2) Ganguli <i>et al.</i> , 2007 ; (3) Subileau <i>et al.</i> , 2008a ; (4) Ganguli <i>et al.</i> , 2007 ; Jaspers <i>et al.</i> , 1985 ; Ubiyvovk <i>et al.</i> , 2006 ; (5) Tominaga <i>et al.</i> , 1998a ; Swiegers <i>et al.</i> , 2007a et b ; Thibon <i>et al.</i> , 2008b ; (6) Swiegers <i>et al.</i> , 2005	166

INTRODUCTION

Les vins jeunes de *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc possèdent un arôme caractéristique intense, distinct de celui des autres cépages et dont les principaux descripteurs sont le poivron vert, le buis, le genêt, le bourgeon de cassis, le fruit de la passion, le pamplemousse, et dans certains cas la fumée ou le silex battu.

Des travaux entrepris, il y a une vingtaine d'année, par l'équipe du Pr Dubourdieu, ont mis en évidence la participation de certains thiols volatils à l'arôme variétal des vins de Sauvignon. La découverte, par Darriet *et al.* (1993), de la 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP), à forte odeur de buis et de genêt, a ouvert la voie à l'identification d'autres composés de même nature chimique dans les vins de Sauvignon blanc. Ainsi plusieurs thiols volatils, marqueurs de la typicité des vins de ce cépage, tels que le 3-sulfanylhexanol, présentant des arômes de pamplemousse et de fruit de la passion, et l'acétate de 3-sulfanylhexyle, aux notes de buis et de fruit de la passion, ont été identifiés (Tominaga *et al.*, 1996 et 1998a). Ces arômes sont produits au cours de la fermentation alcoolique, sous l'action de la levure, à partir de précurseurs inodores présents dans les moûts sous forme de *S*-conjugués. Le premier est associé à la cystéine (*S*-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine ou Pcys3SH), il a été découvert par Tominaga *et al.* en 1998, l'autre est un *S*-conjugué au glutathion (*S*-3-(hexan-1-ol)-glutathion ou Pgsh3SH), mis en évidence par Peyrot des Gachons en 2000. Or, depuis quelques années, certaines études tendent à prouver que les deux types de précurseurs identifiés jusqu'ici ne permettent pas d'expliquer l'intégralité des teneurs en 3SH libéré dans les vins (Subileau *et al.*, 2008b ; Pinu *et al.*, 2012). Pour autant, aucune voie alternative d'une formation significative du 3SH dans les vins n'a été proposée.

L'objectif principal de cette thèse est de parfaire la compréhension des mécanismes de formation du 3SH dans les vins de Sauvignon blanc, à partir des précurseurs du moût.

Ce mémoire présente, dans une première partie, le développement de méthodes de fractionnement par chromatographie liquide des précurseurs du 3SH du moût.

La seconde partie est dédiée à l'identification et au dosage de deux « nouvelles » formes précurseurs du 3SH dans les moûts. Cette approche analytique nous permet d'étudier la contribution de chaque précurseur, déjà connu ou nouvellement identifié dans ce mémoire, aux teneurs en 3SH des vins et leur assimilation par la levure au cours de la fermentation alcoolique.

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIE

I. Thiols volatils

1) L'arôme du Sauvignon blanc

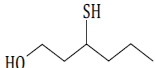
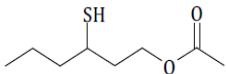
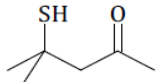
Les vins jeunes de *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc possèdent un arôme caractéristique, intense, et distinct de celui des autres cépages, dont les principaux descripteurs sont le genêt, le bourgeon de cassis, le pamplemousse, le fruit de la passion, et dans certains cas la fumée ou la viande rôtie.

La contribution des thiols volatils à l'arôme du vin est connue depuis une vingtaine d'années, grâce aux travaux préliminaires de Darriet (1993) et de Tominaga (1998c). Ces travaux ont permis, entre autres, d'identifier trois thiols volatils participant à l'arôme variétal du vin de Sauvignon blanc. Il s'agit de la 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP) qui évoque l'odeur de buis et de genêt, du 3-sulfanylhexanol (3SH) présentant des arômes de pamplemousse ou de fruit de la passion, et l'acétate de 3-sulfanylhexyl (A3SH) qui évoque des odeurs de buis et de fruit de la passion (Tableau 1). Ils sont considérés comme les marqueurs de la typicité aromatique de ces vins (Tominaga *et al.*, 1998a).

Les thiols volatils peuvent être divisés en deux groupes principaux, selon leur origine et leur voie de formation. Le premier groupe est composé des thiols volatils « variétaux » présents dans le raisin et le moût sous forme de précurseurs inodores. Ils sont libérés au cours de la fermentation alcoolique, sous l'action du métabolisme de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Tominaga *et al.*, 1998b ; Subileau *et al.*, 2008b ; Thibon, 2006). Le 3-sulfanylhexanol (3SH), son acétate (A3SH) ainsi que la 4-méthyl-4-sulfanylpentane-2-one (4MSP), pour ne citer que les principaux, font partie de ce groupe et contribuent à l'arôme variétal des vins.

Le deuxième groupe est composé des thiols volatils formés au cours de la fermentation alcoolique en barrique ou pendant l'élevage, notamment en fûts de chêne. Ces composés contribuent à l'arôme empyreumatique (benzèneméthanethiol, BM), torréfié (furfurylthiol

Tableau 1 : Structure et descripteurs des principaux thiols volatils « variétaux » identifiés dans les vins de Sauvignon blanc et incidence organoleptique

Composé	Structure	Descripteur	Seuil de perception en solution hydroalcoolique (ng/L)	Concentrations dans les vins (ng/L)
3-sulfanylhexanol (3SH) (Tominaga et al., 1998a)		Fruit de la passion, pamplemousse	60	150-3500
3-sulfanylhexyl acétate (A3SH) (Tominaga et al., 1996)		Buis, fruit de la passion	4,2	0-500
4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP) (Darriet, 1993)		Buis, genêt	0,8	0-120

FFT) ou au bouquet de vieillissement (2-méthyl-3-furanthiol 2M3F) (Tominaga *et al.*, 2003 ; Bouchilloux *et al.*, 1998 ; Blanchard, 2001 ; Tominaga *et al.*, 2006a).

Les principaux thiols volatils contribuant à la typicité des vins de Sauvignon blanc présentent des seuils de perception relativement bas, inférieurs à 60ng/L en solution hydroalcoolique. Le 3SH est présent dans les vins à des teneurs comprises entre 150 et 3500ng/L (Tominaga *et al.*, 1998a ; Dubourdieu *et al.*, 2006), alors que l'A3SH et la 4MSP sont retrouvés à des teneurs plus faibles, respectivement de 0 à 500ng/L (Tominaga *et al.*, 1996 ; Dubourdieu *et al.*, 2006) et de 0 à 120ng/L (Darriet *et al.*, 1995). Les concentrations de ces composés, nettement supérieures à leurs seuils de perception, démontrent leur importante participation à l'arôme de ces vins.

Par ailleurs, le 3SH et l'A3SH sont présents dans les vins sous forme d'énantiomères dû à la présence d'un centre chiral dans la molécule. Tominaga *et al.* (2006b) a étudié leur distribution dans les vins ainsi que leur seuil de perception en solution modèle. Le ratio des formes énantiomériques (*R*) et (*S*) du 3SH et de l'A3SH sont de l'ordre de 50/50 pour le 3SH et de 30/70 pour l'A3SH. Bien que leur seuil de perception ne soit que peu différent, leur descripteur aromatique varie d'une forme à l'autre ; la forme (*R*) du 3SH évoque le zeste de pamplemousse tandis que la forme (*S*) rappelle plus le fruit de la passion. La distribution du 3SH dans le vin peut ainsi influencer la perception et la complexité aromatique.

2) Réactivité des thiols volatils

L'élevage et le vieillissement du vin conduisent à une modification aromatique. Le fruité diminue au profit des notes plus empyreumatiques associées au bouquet de vieillissement. Si les teneurs en thiols, libérés au cours de la fermentation alcoolique, demeurent stables dans les conditions d'un élevage sur lies soigneux de quelques mois, au cours du vieillissement en barrique ou en bouteilles, on observe toujours, quoique lente, une baisse des teneurs en 3SH, 4MSP et A3SH dans les vins (Tominaga 1998c).

En réalité, les propriétés nucléophiles des thiols volatils leur confèrent la possibilité de réagir avec des composés électrophiles tels que les composés polyphénoliques (ex : acide

caftarique) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998-2004b). Concrètement, les thiols volatils vont participer à des réaction d'addition de Michael sur des produits d'oxydation des composés phénoliques (tels que les *O*-quinones), en présence de catalyseurs tels que le fer et le cuivre (Danilewicz, 2007 ; Herbst *et al.*, 2008 ; Nikolantonaki *et al.*, 2010b). Cette réaction a été mise en évidence pour l'addition du glutathion sur des quinones, de l'acide caftarique dans les moûts, conduisant à la formation d'un *S*-conjugué (Grape Reaction Product ou GRP, Cheynier *et al.*, 1986 ; Salgues, 1986), de la (+)-catéchine (Moridani *et al.*, 2001) et de la (-)-épicatechine (Tanaka *et al.*, 2002). Au cours de la vinification, cette réaction est particulièrement favorisée à des concentrations basses en SO₂ (Blanchard *et al.*, 2004 ; Brajkovich *et al.*, 2005 ; Lopes *et al.*, 2009).

En œnologie, cette réactivité est utilisée notamment dans le développement de nouveaux antioxydants contre d'une part le brunissement des moûts et en vue, d'autre part, d'éviter une baisse de la qualité gustative des vins notamment pour la conservation de la typicité variétale (Ribereau-Gayon *et al.*, 1998, 2004).

II. Notion de précurseur d'arôme et révélation du potentiel en 3SH

Les vins de Sauvignon blanc sont typés et fortement aromatiques, toutefois, il s'avère que les moûts ne le sont pas. L'exaltation au cours de la fermentation alcoolique de l'arôme variétal de Sauvignon blanc est ainsi longtemps restée inexpliquée. Toutefois, Peynaud avait pressenti que ces arômes caractéristiques pouvaient provenir de précurseurs d'arômes présents dans le raisin. En 1980, il décrit le phénomène de « retour aromatique ».

« ...lorsqu'on croque le grain doré à peau épaisse du Sauvignon, on ressent le parfum particulier quoique peu intensément. De même, le jus fraîchement préparé est relativement peu odorant et dans un premier temps, l'arôme en bouche est discret. C'est vingt ou trente secondes plus tard, après l'avoir avalé, que brusquement apparaît dans l'arrière cavité du nez, une explosion parfumée, un retour aromatique Sauvignonné. »

De nombreuses études se sont focalisées sur l'élucidation de la formation des thiols volatils dans les vins et il a été démontré que les principaux thiols volatils, comme le 3SH,

Tableau 2 : Structure des précurseurs et intermédiaires de réaction S-conjugués du 3SH

S-conjugués	Structure
<p>S-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine (Pcys3SH) (Tominaga et al., 1998b)</p>	
<p>S-3-(hexan-1-ol)-glutathion (Pgsh3SH) (Peyrot des Gachons et al., 2002b)</p>	
<p>S-conjugué à la γ-glutamylcystéine (Pglucys3SH) (Peyrot des Gachons, 2002a)</p>	
<p>S-conjugué à la cystéinyl-glycine (Pcysgly3SH) (Capone et al., 2012)</p>	

responsables de la typicité des vins de Sauvignon blanc, étaient libérés au cours de la fermentation alcoolique, à partir de précurseurs inodores.

1) Origine des thiols volatils : étude particulière des précurseurs du 3-sulfanylhexanol (3SH)

1.1) Précurseurs S-conjugués

Les premières formes de précurseurs S-conjugués à la cystéine ont été découvertes dans les plantes *Amaryllidaceae*, *Cruciferae* et *Liliaceae* (Kjaer *et al.*, 1963 ; Fowden *et al.*, 1963 ; Virtanen *et al.*, 1965) et en particulier dans l'espèce *Allium* (Stoll *et al.*, 1951). Le développement de ces formes précurseurs implique une activité enzymatique endogène « C-S lyase » (Mazelis *et al.*, 1963), provoquée uniquement par un mécanisme de lésion des tissus (Virtanen *et al.*, 1965). Ils ont également été identifiés dans de nombreuses plantes telles que les asperges, les fruits de la passion (Tominaga *et al.*, 2000) et les poivrons (Starkenmann *et al.*, 2008).

En 1998, Tominaga a été le premier à démontrer que le 3SH était présent dans les moûts sous forme de S-conjugués à la cystéine, en identifiant le S-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine (ou Pcys3SH) dans les moûts de Sauvignon blanc (Tominaga *et al.*, 1998b). Sa structure chimique est présentée dans le Tableau 2. Le rôle de précurseur du Pcys3SH a été démontré par son addition à un milieu modèle, qui a conduit à la libération de 3SH après fermentation alcoolique. Ces composés ont par la suite été identifiés dans les raisins de Merlot, Cabernet Sauvignon, Semillon, Petit et Gros manseng, Melon B et Gewürztraminer (Murat *et al.*, 2001a ; Thibon *et al.*, 2009 ; Roland *et al.*, 2010a). D'autres formes précurseurs S-conjugués à la cystéine ont été identifiées dans les moûts. La 4MSP, par exemple, est également présente dans les raisins (Tominaga *et al.*, 1998b).

Plusieurs études se sont ensuite penchées sur la localisation des formes précurseurs cystéinyliées du 3SH dans les baies de différents cépages. En 2002, Peyrot des Gachons a montré que dans les baies de Sauvignon blanc, à la récolte, les Pcys3SH étaient présents en proportion équitable entre la pellicule et la pulpe (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002a). Dans

les baies de Merlot et de Cabernet Sauvignon, 60% des Pcys3SH sont localisés dans la pellicule et 40% dans la pulpe (Murat *et al.*, 2001a). Enfin, la distribution des précurseurs cystéinylés dans des raisins de plusieurs vignobles de variété *Koshu* a été étudiée et présente des résultats similaires à ceux de Murat (Kobayashi *et al.*, 2010).

Par ailleurs, le Pcys3SH est présent sous forme diastéréoisomérique dans les moûts, et le ratio des formes (*RS*) et (*RR*) dépend de l'état sanitaire des baies (Thibon *et al.*, 2008a). Le ratio des formes varie entre 50/50 et 70/30 selon les raisins et les moûts considérés (Capone *et al.*, 2010).

En 2002, un autre précurseur du 3SH, dont la structure a été associée à un *S*-conjugué au glutathion, a été mis en évidence dans les moûts de Sauvignon blanc. Il s'agit du *S*-3-(hexan-1-ol)-glutathion (Pgsh3SH, Tableau 2) (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002b). Dans les raisins de Sauvignon blanc, le Pgsh3SH est réparti de manière équitable entre la pellicule (57%) et la pulpe (43%) (Roland *et al.*, 2011). Ce précurseur est également présent sous forme de deux diastéréoisomères et majoritairement sous forme (*S*), à la fois dans les moûts et dans les vins (Capone *et al.*, 2010).

En 2002, Peyrot des Gachons a suggéré l'existence d'un composé intermédiaire entre les formes Pgsh3SH et Pcys3SH. Sa présence dans les moûts a été indirectement mise en évidence par réaction enzymatique d'une γ -glutamyl-transpeptidase (γ GT), enzyme responsable de l'élimination du glutamate du glutathion. En effet, le traitement des moûts par réaction enzymatique d'une γ -glutamyl-transpeptidase (γ GT) conduit à la formation de Pcys3SH laissant envisager la présence d'un *S*-conjugué à la γ -glutamylcystéine (Pglucys3SH) (Tableau 2) (Peyrot des Gachons *et al.*, 2000a).

Enfin, très récemment, une dernière forme de *S*-conjugué a été mise en évidence dans les moûts. Il s'agit du *S*-conjugué à la cystéinyl-glycine (Pcysgly3SH) (Capone *et al.*, 2011b) (Tableau 2). La mise au point d'une méthode de dosage a permis de déterminer que ce composé est présent à des concentrations plus faibles que les précurseurs cystéinylés et glutathionylés (quelques $\mu\text{g/L}$) (Capone *et al.*, 2012).

Le rôle de précurseur de ces composés *S*-conjugués à un dipeptide n'a jamais été démontré mais il a néanmoins été montré que ces composés ont des rôles d'intermédiaires

de réaction entre les formes glutathionylées et cystéinylées et que leurs concentrations semblent dépendre de nombreux paramètres encore inconnus (Fedrizzi *et al.*, 2012).

1.1) Voies alternatives de formation du 3SH

Une voie de biogénèse alternative aux formes précurseurs décrites précédemment a été mise en évidence par Schneider *et al.* en 2006, à partir de composés carbonylés insaturés en C₆. Ces composés volatils sont majoritaires dans les moûts et sont générés à partir de lipides insaturés de la baie de raisin. Leurs concentrations dans le Sauvignon blanc, variant de quelques µg/L à quelques centaines de µg/L, sont principalement dépendantes des traitements pré-fermentaires tel que le foulage (Cordonnier *et al.*, 1981). Des valeurs maximales de *trans*-2-hexenal ont été mises en évidence dans le Melon B. (environ 1mg/L) (Schneider, 2006)

Schneider *et al.* ont montré que le *trans*-2-hexenal, en combinaison avec un composé soufré, formait du 3SH, cependant, la nature du composé soufré n'était pas élucidée à l'époque. Ces observations ont été confirmées par la suite, en effet, la supplémentation de *trans*-2-hexenal deutéré à du moût entraîne une libération de 3SH marqué après fermentation alcoolique. Cependant, quelle que soit la souche de levure testée, moins de 5% du 3SH total proviendrait de cette voie (Subileau *et al.*, 2008a). Cette forme précurseur ne semble donc pas majoritaire dans l'explication de la libération de 3SH. Par ailleurs, une étude de 2013 a permis de mettre en évidence la nature d'un composé soufré participant à la libération de 3SH. L'H₂S pourrait alors se combiner au *trans*-2-hexenal, et former du 3SH. De plus, il apparaît également que le *trans*-2-hexenol participe au même titre que le *trans*-2-hexenal à la formation de 3SH (Harsch *et al.*, 2013).

Enfin, le *trans*-2-hexenal peut également se fixer au glutathion pour former du Pgsh3SH. La supplémentation en moût de ces deux composés permettrait alors d'augmenter la libération de 3SH (Roland *et al.*, 2010e).

2) Origine des S-conjugués au 3SH dans le raisin

La coexistence dans les moûts du Pcys3SH et du Pgsh3SH laisse envisager que ces composés sont impliqués dans les voies de détoxification de la vigne. Lors de stress biotique

Tableau 3 : Méthodes d'analyse et de quantification des précurseurs cystéinylés et glutathionylés dans les moûts

Référence	Préparation d'échantillon	Analyse	Avantage / Inconvénient
Peyrot des Gachons <i>et al.</i> , 2000b	Clivage enzymatique, suivi par l'analyse du 3SH libéré	GC-MS (SIM)	(-) 50mL de moût (-) pas de quantification du Pgsh3SH (-) temps d'analyse
Murat <i>et al.</i> , 2001a	Purification par chromatographie d'affinité (chelating sepharose), suivie d'une dérivatisation avec un mélange BSTFA/ TMCS/ pyridine	GC-MS (SIM)	(+) 500µL de moût (-) pas de quantification du Pgsh3SH (-) seulement 1Da de différence entre le Pcys3SH et le Pcys3SH marqué
Thibon <i>et al.</i> , 2008a	Purification par chromatographie d'affinité (chelating sepharose), suivie d'une dérivatisation avec un mélange HFBA/ HFOH	GC-MS/MS	(+) 500µL de moût (-) pas de quantification du Pgsh3SH (+) séparation des diastéréoisomères du Pcys3SH
Luisier <i>et al.</i> , 2008	SPE (Supelclean ENVI 18)	HPLC-MS (SIM)	(+) 8mL (-) pas de quantification du Pgsh3SH (+) une seule étape de préparation d'échantillon
Roland <i>et al.</i> , 2010c	Extraction sur résine échangeuse de cation, suivie d'une purification par SPE (Sep-Pak)	nanoLC-MS/MS	(+) 1,2mL (+) dosage simultané du Pcys3SH, du Pgsh3SH et des précurseurs de la 4MSP par la même méthode (-) deux étapes
Capone <i>et al.</i> , 2010	SPE (Strata SDB-L)	HPLC-MS/MS	(+) (10mL) (+) séparation des diastéréoisomères du Pcys3SH et du Pgsh3SH (+) analyse en moût et en vin
Kobayashi <i>et al.</i> , 2010	Pulvérisation de l'échantillon à l'azote liquide, suivie d'une extraction au méthanol /acide formique et macération de 16h avant injection	HPLC-MS	(+) 5mL (+) séparation des diastéréoisomères du Pcys3SH et du Pgsh3SH (-) temps de macération

ou abiotique, le végétal réagit en libérant, entre autres, des aldéhydes réactifs dont le *trans*-2-hexenal qui, à forte dose, peuvent également engendrer une toxicité pour la levure elle-même (Hatanaka *et al.*, 1993 ; Hamilton-Kemp *et al.*, 2003 ; Myung *et al.*, 2006). Afin de diminuer sa toxicité, une conjugaison au glutathion (glutathion-S-transférase) conduit à la formation de S-conjugués au glutathion (Mueller *et al.*, 2004 ; Thoma *et al.*, 2003), qui seront clivés pour former un S-conjugué à la cystéine dans la vacuole (Kobayashi *et al.*, 2010). Dans la baie, le Pgsh3SH est formé par conjugaison du glutathion sur le *trans*-2-hexenal (Thibon *et al.*, 2011a). Dans un second temps, le Pgsh3SH pourrait être clivé par des γ -glutamyl-transpeptidase et par des carboxypeptidases pour former le Pcys3SH via deux produits intermédiaires, le Pcysgly3SH et le Pglucys3SH, selon l'ordre d'action des enzymes (Wolf *et al.*, 1996 ; Kishimoto *et al.*, 2005).

Une étude publiée par la suite en 2011 par Thibon *et al.* a permis de confirmer que le Pcys3SH était obtenu par clivage du Pgsh3SH et confirme son rôle de « pro-précurseur » (Thibon *et al.*, 2011a).

Par ailleurs, différentes méthodes d'analyses des précurseurs cystéinylés et glutathionylés ont été décrites dans la littérature, et montrent l'évolution des techniques employées au cours du temps (Tableau 3). En effet, la première méthode décrite par Peyrot des Gachons en 2002, basée sur un clivage enzymatique des Pcys3SH, suivi de l'analyse du 3SH libéré, nécessitait un volume de moût de 50mL ; cette méthode n'était pas adaptée à une analyse de routine car elle était chronophage et nécessitait un savoir-faire particulier. De plus, elle ne permettait pas de quantifier le Pgsh3SH. Au cours du temps, les méthodes se sont affinées et ont permis de quantifier à partir d'un volume restreint (de quelques mL à quelques dizaines de mL) le Pcys3SH et le Pgsh3SH, avec une seule méthode d'analyse (purification préalable rapide, suivie d'une analyse chromatographique). De plus, l'optimisation des conditions d'analyses a permis d'abaisser les limites de quantification à des concentrations inférieures au $\mu\text{g/L}$.

Tableau 4 : Synthèse bibliographique des concentrations et pourcentages de bioconversion des précurseurs cystéinylés et glutathionylés

Publication	Concentrations dans les moûts		Taux de biotransformation	
	Pcys3SH	Pgsh3SH	Pcys3SH	Pgsh3SH
	(µg/L)	(µg/L)	(%)	(%)
Caponne <i>et al.</i> , 2010	20 à 55	250 à 600		
Caponne <i>et al.</i> , 2011a	30 à 50	400 à 600		
Caponne <i>et al.</i> , 2012	20 à 60	280 à 450		
Grant-Preece <i>et al.</i> , 2010	50 à 60	460 à 500	3,7	3
Kobayashi <i>et al.</i> , 2010	10 à 15	35 à 50	3,5	0,6
Masneuf <i>et al.</i> , 2006			0,15	
Murat <i>et al.</i> , 2001b			0,6 à 10	
Peyrot des Gachons, 2000a	10 à 40		2 à 9	
Roland, 2010e	7 à 40	1 à 7	1	4,4
Schüttler, 2012	10 à 50	200 à 600		
Subileau <i>et al.</i> , 2008b			< à 1	
Thibon <i>et al.</i> , 2011b	20 à 30	200 à 300		
Winter <i>et al.</i> , 2011			1	0,5

3) Impact des différentes formes précurseurs sur la libération de 3SH

3.1) Teneurs en précurseurs et biotransformation par la levure

De nombreux auteurs se sont penchés sur l'étude des précurseurs cystéinylés et glutathionylés et leur biotransformation en 3SH (Tableau 4).

Grant-Preece *et al.* (2010) indiquent que les précurseurs glutathionylés sont à des concentrations dix fois supérieures aux précurseurs cystéinylés dans les moûts de Sauvignon australiens (Pcys3SH = 50 à 60µg/L ; Pgsh3SH = 460 à 500µg/L) mais avec un taux de transformation plus faible. L'impact final sur la libération en 3SH serait donc équivalent. Pour Roland *et al.* (2010b) et Subileau *et al.* (2008b) la teneur en précurseurs cystéinylés des moûts de Sauvignon du Gers ou de Loire serait six à dix fois supérieure au glutathionylé (Pcys3SH = 7 à 40µg/L ; Pgsh3SH = 1 à 7µg/L) et avec un taux de transformation de trois à quatre fois supérieur. L'impact du précurseur glutathionylé ne serait donc pas majoritaire pour le potentiel en 3SH du raisin. Enfin, selon Kobayashi *et al.* (2010), le précurseur glutathionylé est présent à des concentrations environ trois fois supérieures au cystéinylé dans les moûts de Koshu et de Sauvignon japonais (Pcys3SH = 10 à 15µg/L ; Pgsh3SH = 35 à 50µg/L), mais le taux de transformation du Pgsh3SH en 3SH serait deux à trois fois inférieur à celui du Pcys3SH. Les deux formes précurseurs auraient donc un impact équivalent.

Ainsi, dans le moût, toutes origines et millésime confondus, la teneur en Pcys3SH est comprise entre 7 et 60 µg/L tandis que le Pgsh3SH est retrouvé à des concentrations allant de 1 à 600µg/L. La proportion de ces deux formes dans les moûts semble être davantage méthode dépendante que région dépendante ou millésime dépendant. En effet, le Pcys3SH est en moyenne dix fois moins présent que le Pgsh3SH, à l'exception des résultats présentés par Roland *et al.* où les proportions sont inversées.

De plus, la biotransformation des précurseurs cystéinylés et glutathionylés en 3SH par la levure, présente des rendements très faibles. En effet, les résultats bibliographiques indiquent que 10% maximum des Pcys3SH et 4,4% des Pgsh3SH sont biotransformés en 3SH. Toutefois, les proportions sont inversées dans l'étude de Roland *et al.*

3.2) Etude de la libération de 3SH à partir de ses formes précurseurs

Une faible proportion des formes cystéinyliées et glutathionyliées est transformée en 3SH. Cependant, la seule lecture de ces données ne permet pas d'évaluer la participation de ces formes au potentiel en 3SH (Tableau 4). Subileau en 2008 a montré que moins de 10% de la teneur totale en 3SH est expliquée par le Pcys3SH (Subileau *et al.*, 2008b). De plus, seuls 5 à 7% du 3SH proviendraient du Pcys3SH d'après Roland (Roland, 2010e). Ainsi, l'impact de ce précurseur serait donc loin d'être majoritaire et donc que le 3SH formé aurait probablement une autre origine. L'absence de corrélation entre la concentration du Pcys3SH et du Pgsh3SH des moûts et la libération de 3SH, décrite entre autre par Pinu *et al.* (2012) avait déjà été observée par Peyrot des Gachons (2000a) démontrant que la teneur en 3SH d'un vin de Sauvignon était plus étroitement reliée à la proportion de précurseurs du moût disparu au cours de la fermentation qu'à leur quantité initiale (Peyrot des Gachons, 2000a).

Ainsi, la compréhension des mécanismes impliqués dans la libération de 3SH reste encore inachevée.

4) Révélation du potentiel en 3SH au cours de la fermentation alcoolique

La fermentation alcoolique, réalisée par les levures, est l'étape clé de la révélation de ses thiols volatils. La libération de 3SH à partir du Pcys3SH est réalisée au cours de la fermentation alcoolique par le métabolisme de la levure, sous l'action d'enzymes de type β -lyase ; celles-ci sont responsables du clivage de la liaison C-S du précurseur par α,β -élimination, conduisant à la libération de 3SH (Tominaga *et al.*, 1995).

4.1) Impact de la souche de levure et des conditions de fermentation alcoolique

Le rôle de la souche de levure sur les qualités organoleptiques des vins blancs et rosés a fait l'objet de nombreuses études en œnologie (Murat *et al.*, 2001b ; Swiegers *et al.*, 2005 ; Dubourdieu *et al.*, 2006 ; Peyrot des Gachons 2000a). Il est possible de classer les souches en fonction de leur aptitude à révéler les thiols volatils dans les vins.

Des travaux réalisés en 1993 ont montré pour la première fois que la souche de levure pouvait exercer une influence sur l'intensité de l'arôme variétal des vins de Sauvignon blanc (Darriet 1993). En 2000, Peyrot des Gachons a étudié la libération de 3SH et de 4MSP d'un même moût, par plusieurs souches de levure différentes (VL3c, EG8, VL1 et 522). Selon les souches, la libération d'arômes variait de 0 à 12 ng/L pour la 4MSP et de 2100 à 2900ng/L pour le 3SH. De plus, il est apparu que les pourcentages de précurseurs disparus étaient variables d'une souche à l'autre : de 44 à 78% de disparition pour les précurseurs cystéinylés de la 4MSP, et de 79 à 90% de disparition pour les précurseurs cystéinylés du 3SH (Peyrot des Gachons 2000a). L'effet souche est également très marqué sur le taux d'assimilation des Pcys3SH. Ces résultats ont été validés en 2001 par Murat (Murat *et al.*, 2001b). Plusieurs autres souches ont aussi été testées et il a été mis en évidence que la souche VIN7 libère les concentrations maximales d'arômes de fruit de la passion et de buis alors que la souche VIN13 permet une libération plus forte d'arômes floraux et d'esters (Swiegers *et al.*, 2009).

Par ailleurs, quelle que soit la souche de levure utilisée, la teneur en 3SH dans les vins est dépendante de la température à laquelle est réalisée la fermentation alcoolique. Il semblerait qu'une température de fermentation élevée (18-20°C, en comparaison à une température de 13°C utilisée en vinification en blanc) permet une meilleure expression des arômes variétaux des vins de Sauvignon blanc. De même, il est probable que la température de la fermentation alcoolique favorise l'expression aromatique des cépages contenant également des S-conjugués à la cystéine tels que le Gros Manseng (Tominaga *et al.*, 1995 et 1998b). Par contre, si la température de fermentation est comprise entre 23°C et 28°C, la teneur en 3SH tend à diminuer en fin de fermentation (Masneuf *et al.*, 2006).

Enfin, un dépistage des facteurs physico-chimiques pouvant influencer la libération de thiols volatils a montré que l'azote assimilable était responsable de 35% des variations observées dans la libération de thiols volatils (Thibon, 2006). L'hypothèse serait alors que la biotransformation des précurseurs en 3SH par la levure soit en partie contrôlée par la répression catabolique de l'azote.

La sélection de la souche de levure ainsi que les paramètres de vinification sont donc primordiaux dans la révélation des arômes variétaux caractéristiques des vins de Sauvignon blanc.

4.2) Gènes impliqués dans la biotransformation des précurseurs du 3SH et dans la conversion en acétate de 3SH

De nombreuses études publiées lors de cette dernière décennie ont permis de mettre en évidence une partie des gènes impliqués dans l'assimilation et la biotransformation des précurseurs en 3SH. En 2005, 4 gènes codant pour des C-S lyases ont été mis en évidence (Howell *et al.*, 2005). En 2008, cette étude fut complétée, ce qui permit d'identifier l'enzyme Irc7p comme la C-S lyase à l'origine de plus de 90% de la 4MSP dans les vins (par la biotransformation de son précurseur cystéinylé). En revanche seul 40% du 3SH serait libéré par l'enzyme Irc7p, d'autres gènes interviendraient donc dans la voie métabolique d'assimilation du Pcys3SH (Thibon *et al.*, 2008a). De plus, la teneur initiale en azote assimilable peut induire d'une part la répression transcriptomique du gène *IRC7* en impliquant les facteurs de transcription Gln3p et Gap1p (Ter Schure *et al.*, 2000 ; Scherens *et al.*, 2006), inactivés par la protéine Ure2p en présence d'azote, d'où une diminution de la libération de 3SH. D'autre part, la teneur en azote assimilable initiale contrôle l'expression des gènes impliqués dans le transport des S-conjugués. Le transport du Pcys3SH dans le milieu intracellulaire semble principalement assuré par Gap1p (Subileau *et al.*, 2008b).

La répression catabolique de l'azote ne semble ainsi pas modifier la consommation de précurseurs mais principalement les activités enzymatiques de clivage (Thibon *et al.*, 2008b).

L'assimilation du Pgsh3SH est assurée par le transporteur Opt1p (Subileau *et al.*, 2008a). En revanche, les mécanismes impliqués dans sa biotransformation sont quant à eux peu étudiés. En effet, les enzymes de type β -lyase assurent la rupture de la liaison C-S par une α,β -élimination. Or, dans le cas du Pgsh3SH, le NH_3 de la cystéine en position α n'est pas disponible puisque impliqué dans une liaison peptidique. Ainsi, il apparaît peu probable que ce composé soit directement biotransformé en 3SH par les enzymes préalablement identifiées pour le Pcys3SH (Winter *et al.*, 2011). Enfin, la transformation du 3SH en acétate de 3SH est réalisée au cours de la fermentation alcoolique par la levure grâce à une alcool acétyl transférase. Cette enzyme est codée par les gènes *ATF1* et *ATF2*, chez la levure. La concentration finale en acétate de 3SH

dépend de la balance alcool acétyl transférase (qui favorise l'estérification de l'alcool correspondant) et des estérases, codées par le gène *IAH1* (favorisent l'hydrolyse) (Swiegers *et al.*, 2007a).

III. Influence des paramètres de viticulture et de vinification sur la teneur en 3SH des vins de Sauvignon blanc

1) Viticulture

1.1) Influence des facteurs pédo-climatiques

L'alimentation hydrique et azotée sont clairement identifiés comme deux facteurs déterminants de l'effet « terroir » (Choné *et al.*, 2001 ; Van Leeuwen *et al.*, 1994). D'une part, il apparait qu'une contrainte hydrique modérée favorise un enrichissement des baies en précurseurs cystéinylés du 3SH, alors qu'une contrainte sévère et prolongée, définie comme un stress hydrique, est néfaste à la teneur en précurseur cystéinylés du 3SH et à la qualité aromatique du raisin (Peyrot des Gachons *et al.*, 2005). D'autre part, une contrainte azotée sévère, s'accompagne d'une diminution de la teneur en précurseurs cystéinylés du 3SH et en glutathion dans les baies, et d'une augmentation des composés phénoliques (Choné *et al.*, 2001 ; Choné *et al.*, 2006). A l'inverse, un apport azoté important entraîne une augmentation des teneurs en Pcys3SH de l'ordre d'un facteur 3 (Choné *et al.*, 2006).

1.2) Maturation des baies

Au début de la véraison, la baie ne contient pas ou peu de Pcys3SH alors qu'elle contient déjà les précurseurs cystéinylés de la 4MSP (Peyrot des Gachons, 2000a). Puis, au cours de la maturation de la baie, les teneurs en Pcys3SH vont progressivement augmenter tandis que les teneurs en précurseurs cystéinylés de la 4MSP demeurent stables (Peyrot des Gachons, 2000a). Des études plus récentes ont permis d'une part, de confirmer les résultats obtenus pour les Pcys3SH, et d'autre part de montrer que le comportement du Pgsh3SH au cours de la maturation de la baie est similaire à celui du Pcys3SH (Capone *et al.*, 2011b).

Enfin, il semblerait qu'un pic d'accumulation de Pcys3SH et de Pgsh3SH dans la baie soit atteint 16 semaines après floraison (Kobayashi *et al.*, 2010).

2) Elaboration des moûts

Les différentes étapes conduisant à l'élaboration des moûts peuvent également impacter la typicité des vins. Des expérimentations menées sur le pressurage ont permis de mettre en évidence que les moûts de presse étaient plus riches en précurseurs que les moûts de goutte par extraction des précurseurs présents dans la pellicule (Peyrot des Gachons *et al.*, 2000a). Par ailleurs, la concentration en précurseurs cystéinylés et glutathionylés semble plus importante lorsque les grappes sont vendangées à la machine et lorsque le transport des raisins se fait sur de longues distances (Capone *et al.*, 2011c). Il est donc probable que ces conditions (récolte et transport) entraînent une synthèse de ces précurseurs, expliquant l'augmentation des teneurs en 3SH observées après fermentation alcoolique. Le stockage des baies avant vinification permettrait également d'augmenter les concentrations en précurseurs cystéinylés et glutathionylés. En effet, au bout de 30 heures à 10°C, les concentrations sont augmentées de 2,5 fois pour les précurseurs cystéinylés et de 1,5 fois pour les précurseurs glutathionylés (Capone *et al.*, 2012).

La macération pelliculaire est une autre étape pré-fermentaire réalisée lors de la vinification en blanc (Ollivier 1987), ayant un impact sur les teneurs en précurseurs. Elle permet entre autres, d'augmenter le potentiel aromatique du Sauvignon blanc. Une partie des précurseurs serait extraite par une macération de 18 heures à 18°C des parties solides, et un réel enrichissement en Pcys3SH (55%) a été démontré (Peyrot des gachons *et al.*, 2000a). Son intérêt a également été montré pour les autres cépages blancs du bordelais : Sémillon et Muscadelle (Dubourdieu *et al.*, 1986 ; Ollivier 1987).

3) Préservation des thiols volatils au cours de l'élevage du vin

La maîtrise du degré d'oxydation des moûts est indispensable à l'élaboration de vins de qualité. En effet, les thiols volatils étant des composés très réactifs dans les vins, il est

indispensable de tout mettre en œuvre pour les préserver de l'oxydation. En présence d'oxygène, les composés phénoliques, davantage présents dans les moûts de presse, vont pouvoir s'oxyder et former des quinones. Ces dernières pourront se combiner aux fonctions SH des thiols volatils et ainsi conduire à une perte aromatique. C'est pour cette raison que les vins issus de moûts de presse sont moins aromatiques (Nikolantonaki 2010a). Lors des dégustations, la préférence va généralement aux vins issus de moûts protégés de l'oxydation. Toutefois, une étude a montré qu'à l'échelle industrielle, la cuvée traditionnelle donne des vins plus riches en 3SH que la cuvée inertée, cependant la différence olfactive ne semble pas notable (Roland 2010e).

3.1) Les antioxydants : le dioxyde de soufre

La protection du SO₂ contre les phénomènes oxydatifs repose sur deux mécanismes distincts. D'une part, la concentration en oxygène dissout est abaissée par sa combinaison au SO₂. Plusieurs jours sont néanmoins nécessaires pour le consommer dans sa totalité. D'autre part, le SO₂ pourra avoir une action de protection contre les oxydations, en détruisant les enzymes de type oxydases ou en bloquant leur activité (Crouzet *et al.*, 1998).

La généralisation de l'utilisation du dioxyde de soufre pour la production des vins remonte vraisemblablement à la fin du XVIII^e siècle et, de part ses nombreuses propriétés, telle que son activité antioxydante, il est devenu un auxiliaire de vinification indispensable.

Dans les vins, le SO₂ gazeux ne peut pas exister directement car il réagit quasi instantanément pour donner H₂SO₃, un acide faible pouvant se dissocier selon l'équation présentée dans le Schéma 1.

Schéma 1 Ainsi, au pH des vins, le SO₂ libre est très majoritairement (98%) sous forme d'ions bisulfites (HSO₃⁻), alors que les ions sulfites (SO₃²⁻) sont quasiment absents (Barbe *et al.*, 2000).



Schéma 1 : Equilibre réactionnel du SO₂ en solution aqueuse

Par ailleurs, dans les moûts et les vins, le SO₂ réagit principalement avec les composés carbonylés pour donner des combinaisons bisulfitiques plus ou moins réversibles, il est alors

qualifié de SO₂ combiné. Le SO₂ est retrouvé sous forme combinée à différents composés tels que l'éthanal, les corps cétoniques comme l'acide pyruvique et l'acide 2-oxoglutarique, les sucres et ses dérivés, tels que le 5-oxofructose et l'acide gluconique, ou encore aux molécules dicarboxylées comme le glyoxal (Burroughs, 1975 ; Barbe *et al.*, 2000 ; Barbe *et al.*, 2001 ; Barbe *et al.*, 2002).

3.2) Les antioxydants : le glutathion

Le glutathion, tripeptide constitué de glycine, de cystéine et d'acide glutamique, est très largement répandu dans les plantes, les champignons et les aliments (Friedman 1994) et peut être présent à la fois sous sa forme réduite et sous sa forme oxydée. Il a été identifié pour la première fois dans les raisins en 1989 et ses concentrations sont très influencées par le millésime, la localisation et la variété. La teneur en glutathion peut varier entre 17 et 114mg/kg selon la variété de *Vitis vinifera* (Cheynier *et al.*, 1989).

Dans le moût, le glutathion va pouvoir réagir avec les composés d'oxydation telles que les quinones, formant notamment l'acide 2-S-glutathionyl-caftarique ou Grape Reaction Product (GRP) (du Toit *et al.*, 2007 ; Singleton *et al.*, 1985 ; Cheynier *et al.*, 1986). Une autre partie du glutathion est susceptible d'être éliminée du moût par oxydation en disulfure (Adams *et al.*, 1993). Malgré la forte réactivité du glutathion vis-à-vis de l'oxygène et des composés phénoliques, ce composé demeure en partie sous sa forme réduite (environ 3 à 25 mg/L) (Dubourdieu *et al.*, 2003). Ces résultats ont pu être obtenus grâce au développement d'une méthode de dosage qui préserve l'équilibre des formes réduites et oxydées de ce composé (Lavigne *et al.*, 2007).

Au cours de la fermentation alcoolique, les concentrations en glutathion vont dans un premier temps diminuer (assimilation par les levures), puis ce composé sera progressivement libéré. L'enrichissement des vins en glutathion à la fin de la fermentation alcoolique confère alors au vin un pouvoir réducteur, préservant ainsi les thiols variétaux des vins de Sauvignon blanc (Dubourdieu *et al.*, 2003).

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

I. Moûts et vins

Plusieurs moûts de Sauvignon blanc ont été prélevés lors des vendanges et proviennent de différentes régions et de différents millésimes.

Millésime 2011 : Prélèvements à Château Reynon, Château La Louvière, Sicavac, Château d'Yquem, Mas de Libian, Vignoble Ducourt et aux Vignerons de Tutiac

Millésime 2012 : Prélèvements à Château Couhins, Château La Louvière, Château Reynon et aux Vignerons de Tutiac

Millésime 2013 : Prélèvements à Château Couhins et Sicavac

Deux types de prélèvements ont été réalisés, les premiers concernent des échantillons destinés à réaliser des dosages de précurseurs ainsi que des analyses œnologiques courantes (azote assimilable, pH, concentration en sucres, acidité totale) ; ils sont ajustés à 100mg/L de SO₂ libre, stockés directement dans des pots de prélèvements de 100mL au congélateur, sans analyse préalable.

Les deuxième prélèvements correspondent aux moûts récoltés en gros volume (jusqu'à 50L), destinés à la purification de précurseurs. Un réajustement à 30mg/L de SO₂ libre est réalisé. Le moût est ensuite stocké au congélateur dans des pots de prélèvements de 1L ou de 5L.

II. Analyse des thiols volatils

1) Protocole de purification

La méthode utilisée pour extraire sélectivement les thiols volatils en petit volume est celle décrite par Tominaga *et al.* (2006a).

7,5 mL d'une solution d'acide p-hydroxymercuribenzoate de sodium (p-HMB) (2 mM), préparée dans un tampon Trizma® base [2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol] sont ajoutés à un volume de 50 mL de vin préalablement centrifugé et contenant 1,2 nmol d'étalons internes [1-méthoxy-3-méthyl-3-butanethiol (1,3,3MMB)] et [6-sulfanylhéxanol] (0,1 M ; pH 10). Le pH est ajusté à pH 7 avec une solution de soude (NaOH, 10N) et la complexation des thiols volatils avec le p-HMB se réalise sous agitation magnétique à 300 rpm pendant 10 minutes.

Les adduits p-HMB/thiols sont fixés sur résine échangeuse d'anions (Dowex 1X2 ; 50-100 mesh ; 1,5 x 3 cm, Fisher Scientific) réactivée préalablement à l'acide chlorhydrique (0,1 M). La colonne est lavée par 50 mL d'une solution tampon d'acétate de sodium (0,1 M ; pH 7). Les thiols volatils sont libérés par percolation de 60 mL d'une solution de cystéine (pH 7 ; 35 mM).

500 µL d'acétate d'éthyle (CHROMASOLV®, Sigma-Aldrich) sont additionnés dans l'éluat ainsi récupéré. Puis celui-ci est extrait par du dichlorométhane (4 puis 3 mL) pendant 10 minutes à 900 rpm. Les deux phases organiques sont rassemblées et séchées au sulfate de sodium anhydre, puis concentrées sous flux d'azote jusqu'à 50 µL.

2) Appareillage

L'analyse des échantillons est réalisée par un chromatographe en phase gazeuse (6890 Agilent technologie), équipé d'une colonne capillaire DB-WAXETR (60m x 0,25mm, 0,25 µm) (Agilent).

La pression du gaz vecteur (Hélium) est de 20 psi et le programme est le suivant : départ à 45°C, puis 15°C par min jusqu'à 75°C, puis 6°C/min jusqu'à 160°C, puis 9°C/min jusqu'à 205°C, puis 40°C/min jusqu'à 260°C. L'injection se fait en mode splitless (temps de fermeture de 30 sec, température de l'injecteur : 230°C). La détection s'effectue en mode SIM, sur un spectromètre de masse quadripolaire (MSD 5975, Agilent technologies) travaillant en impact électronique (énergie d'ionisation de 70eV, source à 250°C).

3) Quantification des composés

La quantification des thiols volatils est effectuée en sélectionnant les ions spécifiques chargés.

Le dosage de ces composés est réalisé en mesurant l'abondance de ces ions caractéristiques rapportée à celle de l'étalon interne. Selon les thiols à doser, deux étalons internes sont utilisés :

- le 6-sulfanylhéxan-1-ol (6-SH), détecté avec les ions m/z 101, 116 et 87. L'ion m/z 101 est l'ion de quantification.
- Le 1-méthoxy-3-méthyl-3-butanethiol (1,3,3MMB), détecté avec les ions m/z 134, 100 et 75. L'ion m/z 134 est l'ion de quantification.

Le 3SH est détecté avec les ions m/z 134 et 100 et quantifié avec l'ion m/z 134 et l'A3SH est détecté avec les ions m/z 87, 101 et 116 et quantifié avec l'ion m/z 116.

Par ailleurs, en vue de réaliser des gammes étalon, il est nécessaire de mesurer la concentration en thiols des solutions mères commerciales.

4) Mesure colorimétrique de la concentration en thiols

L'échantillon à doser est dilué dans une solution de tampon phosphate (0,1M, pH=8), puis additionné d'une solution tamponnée de l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB, « réactif d'Ellman ») (4g/L) (Ellman, 1959). Ce dernier donne un anion coloré jaune, 5-sulfanyl-nitro-2-benzoate dont on mesure l'absorbance à 412 nm. Il s'agit d'un réactif spécifique permettant la détection des fonctions thiols (sulfanyl). La coloration est proportionnelle au nombre de groupements thiols présent. La sensibilité de cette méthode est de l'ordre de 10^{-4} M.

L'appareil de mesure de densité optique est un spectromètre à double faisceau, modèle Genesys 6, Thermo spectronic. Les cuves, en polymère, ont un trajet optique de 1cm. La concentration en thiol est alors calculée à l'aide du coefficient d'extinction molaire ($\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1}$) du chromophore libéré par la réaction de combinaison d'une molécule thiol au DTNB.

III. Analyse des précurseurs du 3SH

1) Protocole de purification

2.1) Dans les moûts

Le dosage de l'ensemble des précurseurs d'arômes du 3SH nécessite une purification de l'échantillon par SPE, associé à un système de vide (Vac Elut 20 Manifold, Varian). Les cartouches de SPE LC-18, 500mg (Supelclean, Supelco) de 6mL sont préalablement conditionnées par 5mL de méthanol, puis 4mL de méthanol/eau 50/50 (v/v), puis 2*2mL d'eau. L'échantillon de moût à purifier (1mL) est centrifugé et additionné à 1mL d'eau distillée ainsi que 25µL d'étalon interne (d_3 -S-3-(hexan-1-al)-glutathion à 1,5mg/L) (Pgsh3SH-D3). L'échantillon est ensuite percolé à 1mL/min. La cartouche est ensuite lavée avec 2*1mL d'eau avant d'être séchée 1 à 2 minutes. L'élution des composés d'intérêt est réalisée avec 3mL de méthanol/eau 30/70 (v/v) à 1mL/min. Les échantillons sont ensuite évaporés à sec au Rapidvap (Labconco) (vitesse 60-75% ; 45°C ; vide 4-10mbar). Les échantillons sont repris dans 2*350µL (HCOOH, 0,1%), filtrés sur 0,45µm et placés en vial. Enfin, la cartouche est reconditionnée en vue d'une utilisation ultérieure (2mL de méthanol + 0,1% HCl puis 10mL de méthanol).

2.2) Dans les vins

250µL de vin centrifugé sont additionnés de 25µL d'étalon interne (Pgsh3SH-D3) et de 500µL d'eau (HCOOH, 0,1%) avant d'être filtrés sur 0,45µm et placés en vial.

2) Appareillage

L'injection est automatisée grâce à un passeur d'échantillons HTC PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Suisse), puis l'analyse est réalisée par un système Accela U-HPLC composé de pompes quaternaires, d'une source d'ionisation par électronébulisation chauffée « HESI -I» (Heated ElectroSpray Ionisation) et d'un analyseur Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France). La séparation des molécules est réalisée sur une colonne de silice à polarité de

Tableau 5 : Conditions d'analyse des dosages de précurseurs du 3SH par HPLC-MS. Voie A = eau + 0,1% HCOOH. Voie B = acétonitrile + 0,1% HCOOH

Temps (minutes)	Voie C (%)	Voie D (%)
0	91	9
0,8	91	9
5	60	40
5,2	10	90
6,1	10	90
6,2	91	9
6,5	91	9

phase inversée de type C₁₈ (**Synchronis™ aQ Column** 2.1mm x 100mm, 1.7µm, Thermo Fisher Scientific). La détection s'effectue en mode positif.

Le traitement des données est effectué sur l'application Qualbrowser du logiciel Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific). Des filtres peuvent être appliqués afin de visualiser les chromatogrammes d'ions extraits correspondant aux *m/z* recherchés. L'intégration de ces pics permet d'obtenir des informations sur l'abondance de chaque ion observé.

Les températures et tensions de la source HESI sont de 350°C et de 3,5kV, et de 350°C et 32,5kV pour le capillaire. La tension du tube lens est de 85V et celle du skimmer de 18V et la gamme de masse s'étend de 100 à 800 uma.

3) Conditions chromatographiques

La pression à l'entrée de la colonne est d'environ 600mbar pour un débit de 300µL/min constant lors de l'analyse et le programme est présenté dans le Tableau 5. La voie C correspond à de l'eau + 0,1% d'acide formique, et la voie D à de l'acétonitrile + 0,1% d'acide formique. Le volume d'échantillon injecté est de 5µL.

4) Protocole de dérivation

100µL d'une solution d'hydroxylamine (6,98 mg/mL, méthanol /eau ; 50/50 v/v) sont additionnés sur le Pgsh3SH-Al. La réaction est réalisée à température ambiante après agitation (vortex/ultrasons). La réaction est arrêtée par l'addition de 400µL d'une solution aqueuse de méthanol (50/50, v/v).

IV. Analyses œnologiques courantes

1) Dioxyde de soufre libre

Le dioxyde de soufre libre est dosé selon la méthode de Ripper (OIV, 1990). A 20 mL de vin sont ajoutés 2 mL d'acide sulfurique au 1/3. La titration se fait avec de l'iode N50.

2) Sucres réducteurs et azote assimilable

Les analyses courantes de ces paramètres ont été réalisées par le laboratoire SARCO, par réflectance aux rayons infra-rouges à l'aide de l'appareil Infra-Analyseur (Technicon, France). La teneur en azote assimilable est déterminée par dosage enzymatique.

V. Traitement des moûts au charbon actif

Le moût est additionné de 50g/L de charbon. Le charbon est préalablement repris dans de l'eau (pendant 5 minutes). Le mélange est ensuite agité pendant 30 minutes, décanté 48h, puis filtré sur pré-filtres papier grâce à un système de vide jusqu'à éliminer la quasi-totalité des particules de charbon, ceci en vue d'éliminer une grande partie des composés phénoliques.

VI. Microvinifications

1) Milieu modèle de fermentation

Afin de révéler les thiols volatils présents sous forme de précurseurs, il est nécessaire de soumettre nos extraits à une fermentation alcoolique. L'utilisation d'un milieu modèle est donc nécessaire et mime les caractéristiques d'un moût blanc. Cependant, selon les essais, l'élaboration du milieu modèle est différente, en effet, il est nécessaire dans certains cas de le concentrer deux fois. Ce milieu modèle a été mis au point par Bely *et al.* (1990) puis modifié par Marullo *et al.* (2006). Nous avons cependant modifié les teneurs en sucres. La composition du milieu modèle est décrite ci-dessous.

- Sucres : D-glucose (50g/L), D-fructose (50g/L)
- Acides organiques : Acide tartrique (3g/L), acide citrique (0,3g/L), acide L-malique (0,3g/L)
- Sels minéraux : KH_2PO_4 (2g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (200mg/L), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4mg/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4mg/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1mg/L), KI (1mg/L), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,4mg/L), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1mg/L), H_3BO_3 (1mg/L)

- Vitamines : Méso-inositol (0,3g/L) Biotine (0,04 mg/L), thiamine (1mg/L), pyridoxine (1mg/L), acide nicotinique (1mg/L), acide panthoténique (1mg/L)
- Facteurs anaérobies : ergostérol (1,5mg/L), oléate de sodium (0,5mg/L), 0,05mL de Twenn 80/éthanol (1/1, v/v)
- Sources d'azote : sulfate d'ammonium (0,32g/L)

Le pH de cette solution est ensuite ajusté à 3,3 à l'aide de pastilles de potasse (KOH), puis stérilisé par filtration sur membrane de nitrate de cellulose 0,45µm (Millipore, Molsheim, France), selon les conditions.

2) Souche de levure *Saccharomyces cerevisiae*

La souche de levure utilisée dans ce travail appartient à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* et proviennent de la société LAFFORT (Zymaflore X5). Elle est sous forme de levure sèche active.

Les milieux de culture sontensemencés à 200mg/L avec la souche Zymaflore X5. Pour réhydrater la levure, celle-ci est placée dans du moût dilué au demi 30 minutes à 37°C puis 1h à température ambiante avant d'êtreensemencée.

3) Contrôle des paramètres de fermentation

Les fermentations sont réalisées dans une chambre thermostatée à 24°C obscure, dans laquelle sont placées des bouteilles brunes de 100mL munies d'un barreau aimanté ainsi que de bouchons permettant une libération de CO₂. Les milieux fermentaires sont ainsi placés en agitation à 200rpm grâce à l'utilisation de plaques d'agitation. Le suivi de la fermentation se fait grâce à la mesure de la perte de poids due au dégagement de CO₂.

4) Dosage colorimétrique

En vue de vérifier si la fermentation est totalement terminée, un dosage colorimétrique rapide est réalisé grâce à des pastilles Clinitest® (Bayer). Une fois la pastille dissoute dans 5 gouttes d'échantillon à doser plus 10 gouttes d'eau, la couleur indique la concentration en sucre.

5) Sulfitage et conservation des échantillons

En fin de fermentation, les échantillons sont sulfités à 5g/hL avec du SO₂ à 10%. Les bouteilles n'étant pas pleines, des billes sont rajoutées en vue de diminuer le volume d'air présent et la possible oxydation des échantillons. Les échantillons peuvent être stockés quelques jours à 4°C avant d'être analysés.

6) Suivi des précurseurs au cours de la fermentation alcoolique

L'évolution de l'assimilation des précurseurs est réalisée par des prélèvements réguliers du milieu fermentaire. Chaque prélèvement de 1,5mL est immédiatement centrifugé puis congelé en vue d'analyse.

VII. Synthèse du Pgsh3SH-Al et Pgsh3SH-SO₃

1) Synthèse du S-3-(hexan-1-al)-glutathion

Le S-3-(hexan-1-al)-glutathion est synthétisé de la sorte :

5 mmol de *trans*-2-hexenal sont additionnés à une solution en agitation contenant 4 mmol de glutathion et 2 mmol de carbonate de césium ou 1 mmol d'HCl, dans de l'eau ultrapure. Le mélange est agité toute la nuit à température ambiante. Il est ensuite extrait avec du diéthyl éther (2*30mL) dans le but d'éliminer l'excès de *trans*-2-hexenal. Le rendement de cette réaction est de 64% et la pureté de 68%.

2) Synthèse de l'acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique

L'acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique est synthétisé de la sorte :

L'addition de SO₂ à 10 équivalents Pgsh3SH-Al conduit à une réaction totale après deux heures d'incubation à température ambiante. Un dosage du Pgsh3SH-Al est réalisé en fin de réaction afin de valider la totalité de la réaction. Celle-ci présente un rendement de 100% et une pureté de 70%.

Tableau 6 : Références des différentes résines utilisées en SPE

Résine
Chromatographiegel C-Gel C-18 C-560, All Tech
Puriflash IR 100 C ₁₈ , Interchrom
Polygoprep 60-30 C ₁₈ non encapped, Macherey Nagel
Amberlite® XAD-2, copolymère de styrène-divinylbenzène, Supelco
Amberlite® XAD-4, copolymère de styrène-divinylbenzène, Supelco

VIII. Protocole de purification

1) Chromatographie en phase solide (*Solid-phase extraction*, ou SPE)

1.1) Protocole de purification sur résine

Chaque résine (50g) préalablement reprise dans du méthanol est coulée dans une colonne SPE (empty SPE tubes PP 100mL, Interchrom) reliée à un système de vide (VacElut 20 Manifold, Varian). Après conditionnement par 300 mL de méthanol et 300 mL d'eau, 150 mL de moût préalablement centrifugé (soit un volume moyen de 3 mL par gramme de résine) sont percolés à un débit d'environ 3mL/min. La colonne est ensuite rincée par 100 mL d'eau afin d'éliminer les composés non retenus sur la résine tels que les sucres ou les acides du moût. L'élution est réalisée par deux solutions à concentrations croissantes en méthanol (300 mL pour chaque palier sélectionné). Différentes résines ont été étudiées et les références sont présentées dans le tableau 6.

1.2) Préparation des fractions en vue de réaliser une fermentation alcoolique.

Les fractions non retenues (FNR) sont directement mises à fermenter alors que la fraction de lavage est préalablement concentrée deux fois et additionnée à du milieu modèle (lui-même concentré deux fois). Enfin, les fractions d'élution sont évaporées à sec, lyophilisées puis additionnées à un milieu modèle. Avant ensemencement, un prélèvement est réalisé afin de déterminer la teneur en formes précurseurs connues. Une fois la fermentation achevée, le 3SH libéré est analysé.

2) Chromatographie de partage centrifuge (CPC)

2.1) Appareillage

Un système CPC complet automatisé est composé :

- d'un appareil Armen SCPC-100+1000-B (2 colonnes CPC de capacité de 100 mL et 1000 mL)
- d'un appareil Armen Spot prep 250 qui permet de travailler avec des colonnes CPC et LC préparative. Cet appareil est composé d'une pompe 250mL/min, d'un détecteur UV double longueur d'onde (200-600nm), d'un collecteur de fraction. L'ensemble étant piloté par le logiciel Armen Glider CPC : AGCPC permettant d'automatiser la purification.

Tableau 7 : Méthode d'analyse du fractionnement des S-conjugués du 3SH, par chromatographie de partage centrifuge. La voie A correspond à la phase aqueuse tandis que la voie B correspond à la phase organique

Temps (min)	Débit (mL/min)	Mode	Vitesse de rotation (rpm)	Eau Voie A (%)	Butanol Voie B (%)
Préparation de la colonne					
00 :00	0	Descendant	500	0	100
40 :00	0	Descendant	500	0	100
Equilibration					
00 :00	100	Descendant	2000	100	0
15 :00	100	Descendant	2000	100	0
Injection de l'échantillon et élution					
00 :00	100	Descendant	2000	100	0
120 :00	100	Descendant	2000	100	0
Extrusion					
120 :00	0	Descendant	2000	0	100
160 :00	0	Descendant	2000	0	100

2.2) Paramètres d'analyse

Le système de solvants sélectionné est composé de Butanol/méthanol/eau en proportions 36,4/10,6/53, à pH=2,5 (acidifié par ajout d'HCl). Le fractionnement est réalisé en mode descendant (la phase stationnaire correspond au butanol saturé en eau et méthanol ; la phase mobile correspond à la phase aqueuse saturée en butanol et méthanol, Tableau 7). Le logiciel du Spot Prep, commun à l'utilisation de la chromatographie Flash, doit être en configuration CPC (Armen V1, R1 or R2 + Com 4, Valve injection).

2.3) Etude des fractions

Les tubes collectés en sortie de CPC sont analysés en LC-MS (tous les 5 tubes). 500µL seront prélevés et additionnés à 25µL d'étalon interne, évaporés et repris dans 700µL d'HCOOH à 0,1% avant d'être injectés. Le regroupement des tubes sera réalisé selon la distribution des précurseurs. Après regroupement, un dosage des précurseurs est réalisé (500µL, injection directe). Les regroupements seront ensuite évaporés, lyophilisés et repris dans 2mL d'eau avant d'être stockés au congélateur.

Une partie des 2mL sera ensuite additionnée à du milieu modèle, à des teneurs variables et détaillées dans la partie résultat. 1,5mL sont prélevés avant ensemencement, et le dosage des précurseurs est réalisé selon la méthode décrite dans la partie III.

Le 3SH libéré en fin de fermentation est analysé.

2.4) Détermination des coefficients de partage (K_D)

2.4.1) Coefficients de partage des précurseurs

Le système de solvants est préparé en petit volume (5mL de phase supérieure organique et 5mL de phase inférieure aqueuse, contenant ou non des sels), et supplémenté en Pcys3SH et Pgsh3SH à 250µg/L.

Tableau 8 : Références des différentes résines de chromatographie Flash

Références résines
PuriFlash IR C ₁₈ 20g (Interchrom)
PuriFlash IR C ₁₈ 300g (Interchrom)
PF30 C ₁₈ aQ 35g (Interchim)
Chromabond Flash RS4 C ₁₈ 8g (Macherey-Nagel)
Chromabond Flash RS330 C ₁₈ ec 330g (Macherey-Nagel)

Tableau 9 : Méthode d'analyse du fractionnement de 5L de moût par chromatographie Flash

Temps (min)	Débit (mL/min)	Moût (voie A) (%)	Eau (voie B) (%)	Méthanol (voie C) (%)
Equilibration				
00 :00	100	0	0	100
18 :00	100	0	0	100
27 :00	100	0	100	0
45 :00	100	0	100	0
Elution				
00 :00	100	100	0	0
50 :00	100	100	0	0
50 :03	100	0	100	0
60 :00	100	0	100	0
110:00	100	0	0	100
130 :00	100	0	0	100

Après agitation forte, 1mL de chaque phase est prélevé, additionné de 25µL d'étalon interne Pgsh3SH-D, séché, redissout dans 700µL d'HCOOH à 0,1% et injecté, dans le cas où la phase aqueuse est dépourvue en sels. Si la phase aqueuse contient des sels, l'extrait est redissout dans 1mL et purifié sur C₁₈ par la méthode d'analyse classique des moûts.

2.4.2) Coefficients de partage du 3SH

Pour déterminer le coefficient de partage du 3SH, il est nécessaire dans un premier temps de rajouter l'extrait d'intérêt à un volume d'eau et de l'extraire par un même volume de solvant. Puis, un volume équivalent de chacune des phases est prélevé, évaporé, lyophilisé et additionné à un milieu modèle pour être fermenté. Enfin, un dosage du 3SH libéré est réalisé.

3) Chromatographie Flash

Le fractionnement des moûts par chromatographie Flash en gros volume (5L) est décrit dans le tableau 9. Les tests préliminaires, réalisés avec différentes cartouches (tableau 8), sont détaillés dans la partie résultats.

La collecte est de 25mL/tube. La détection UV se fait à 280nm. Le logiciel doit être en configuration Flash (NONE, Rotor décoché, AUTO, Pmax à 20bars).

L'étude des fractions obtenues en sorties de chromatographie Flash est identique à celle réalisée en sortie de CPC.

PARTIE 1 : OPTIMISATION DES CONDITIONS DE PURIFICATION DES PRECURSEURS DU 3SH A PARTIR DE MOUTS DE SAUVIGNON BLANC

A l'heure actuelle, les seuls composés identifiés et caractérisés comme précurseurs du 3-sulfanylhexanol (3SH), c'est-à-dire participant de manière significative à la libération de ce thiol volatil dans les vins, sont le *S*-3-(hexan-1-ol)-cystéine et le *S*-3-(hexan-1-ol)-glutathion. L'importance de leur contribution est fortement controversée. En effet, il n'existe pas de consensus, ni sur leur teneur relative dans les moûts, ni sur leur pourcentage de biotransformation par la levure (cf. étude bibliographique). Quoiqu'il en soit, il apparaît que leur seule présence ne permet d'expliquer qu'une partie du 3SH libéré dans le vin. Ainsi, il doit exister dans le moût d'autres composés qui participent directement ou indirectement à cette libération.

Nous avons comme objectif de montrer s'il existe des composés précurseurs autres que ceux connus et si c'est le cas de les identifier. Cette partie se consacre à la mise au point de techniques de purification et de fractionnement des espèces chimiques capables de libérer du 3SH, sous l'action du métabolisme des levures.

CHAPITRE 3 : FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE

LIQUIDE BASSE PRESSION

Au cours de leur thèse, Darriet (1993) et Tominaga (1998c) ont démontré qu'il était possible d'effectuer une purification partielle des précurseurs d'arôme du Sauvignon blanc, par chromatographie en phase inverse sur silice greffée par des groupements octadécyles (C₁₈). Ils ont ainsi obtenu à partir du moût des fractions renfermant les composés responsables de la libération de l'arôme variétal du Sauvignon. Cette technique de chromatographie en phase solide (*Solid-phase extraction*, ou SPE) repose sur le fait que les composants sont plus ou moins retenus à la surface de la phase stationnaire par adsorption physique en fonction de leur hydrophobicité. Ainsi, ils ont pu démontrer que la percolation du moût sur silice greffée C₁₈ entraîne dans les vins une baisse très importante de la teneur en thiols volatils et jusqu'à une diminution de plus de 90 % de la concentration en 3SH par rapport au moût témoin, tandis que la fermentation en milieu modèle de la fraction éluée par l'éthanol de la colonne révèle jusqu'à 66 % du 3SH contenu dans le vin témoin (Tominaga, 1998c).

Ainsi, il est possible d'obtenir un extrait de moût renfermant les précurseurs d'arômes par chromatographie du moût sur silice greffée C₁₈.

Dans ce chapitre, nous avons cherché à optimiser cette technique afin non plus de pré-purifier mais de fractionner et donc d'isoler les molécules responsables du potentiel en 3SH du moût. L'analyse du 3SH libéré après fermentation alcoolique de chaque fraction devrait nous permettre d'identifier des fractions potentiellement précurseur d'arôme (FPPA). L'analyse avant fermentation alcoolique des formes précurseurs connues (*S*-cystéinylées et *S*-glutathionylées) permettra de vérifier si le potentiel en 3SH du moût est systématiquement ou non associé à la présence de ces composés.

I. Résultats préliminaires

Ainsi, en 1998, il a été clairement démontré qu'une partie du potentiel aromatique pouvait être retenue sur silice greffée. La méthode de préparation de l'extrait de précurseurs de l'arôme du Sauvignon (PAS) consistait à percoler un gros volume de moût (15L) sur une silice greffée (1kg) préalablement conditionnée dans une colonne en verre (1,5L) et préparée par élution successive par de l'éthanol (4L) et de l'eau distillée (3L). Après percolation du moût, la colonne était ensuite rincée par 5 fois son volume d'eau et les PAS bruts étaient élués par de l'éthanol (2L). Après évaporation de l'extrait ainsi obtenu, la purification était poursuivie par une seconde chromatographie sur silice greffée C₁₈ en plus petit volume (50g). Les PAS étaient élués par de l'éthanol 1% (Darriet 1993) ou 10 % (Tominaga, 1998c).

Cependant, l'impossibilité de doser conjointement les S-conjugués à la cystéine et au glutathion ne rendait pas possible le suivi et le contrôle du fractionnement. Des premiers essais ont été réalisés sur des moûts de Sauvignon selon cette technique (résultats non présentés) et il s'est avéré que nous n'arrivions pas à contrôler suffisamment les débits et le gradient de solvants pour fractionner finement le potentiel en 3SH du moût. De plus, nous avons été confrontés à un problème de reproductibilité inter-manipulations au niveau de l'élution des précurseurs connus du 3SH.

Afin d'optimiser le fractionnement des moûts, nous avons, dans un premier temps testé la capacité de rétention et la résolution de cartouches pré-remplies de silice greffée en C₁₈ (ENVI-18, Supelclean, 5g, 20 mL). Les avantages principaux de ces cartouches sont, d'une part, leur capacité de charge et leur résolution analytique et, d'autre part, le fait qu'elles peuvent être reliées à un système de vide pour faciliter la percolation. Les composés sont ensuite élués par des concentrations croissantes de méthanol en solution dans l'eau. Dans cet essai, 100 mL de moût ont été percolés sur la cartouche, et l'élution a été réalisée par palier par un gradient de méthanol. Les fractions correspondantes à une concentration donnée de méthanol sont récupérées successivement, les précurseurs cystéinylés et glutathionylés sont quantifiés et une fermentation alcoolique est réalisée afin d'estimer la libération des thiols volatils.

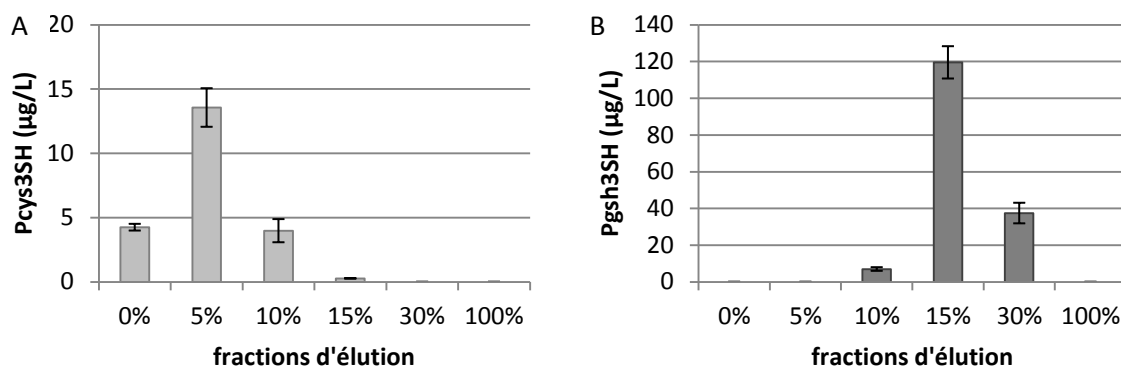


Figure 1 : Dosage des précurseurs cystéinylés (A) et glutathionylés (B) dans les fractions obtenues par percolation du moût sur ENVI-18 (5g). Chaque palier d'élution correspond à une fraction matérialisée par son pourcentage de méthanol (n=2)

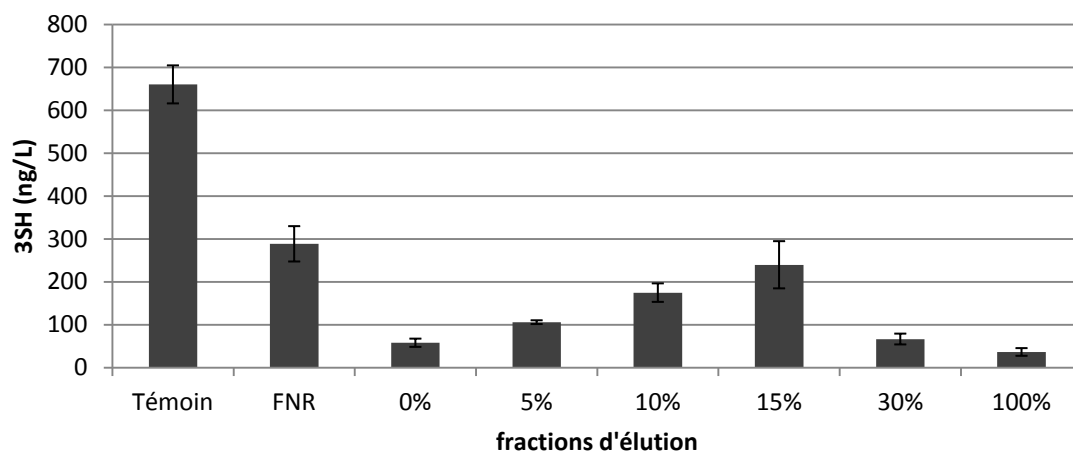


Figure 2 : Dosage du 3SH libéré après fermentation du moût témoin ou des fractions obtenues après percolation du moût sur ENVI-18 (5g). Chaque palier d'élution correspond à une fraction matérialisée par son pourcentage de méthanol. FNR : fraction non retenue (n=2)

Le dosage des précurseurs dans les fractions obtenues par percolation du moût sur ENVI-18 est présenté dans la Figure 1. Il apparaît clairement que les précurseurs cystéinylés et glutathionylés peuvent être collectés séparément sur cette cartouche. Cependant, le Pcys3SH est élué dès la percolation de l'eau de rinçage (Figure 1A). Il semble donc que ce composé soit mal adsorbé sur la silice. En revanche, le Pgsh3SH est élué par la percolation d'une solution de méthanol à 15% et est totalement absent dans la fraction de lavage de la colonne à l'eau (0%, Figure 1B).

L'analyse du 3SH libéré au cours de la fermentation à partir des différentes fractions obtenues est présentée dans la figure 2. Un témoin a également été réalisé par fermentation du moût non percolé sur la cartouche afin de connaître son potentiel en 3SH. Il apparaît qu'une grande quantité de 3SH est retrouvée dans la fraction non retenue sur la cartouche (FNR), comme préalablement observé pour le Pcys3SH dans la fraction de lavage de la colonne après percolation du moût. En revanche, une libération de 3SH importante est détectée dans les fractions 5, 10 et 15% de méthanol.

Il apparaît que les fractions libérant le plus de 3SH ne sont pas systématiquement celles qui contiennent le plus de précurseurs cystéinylés et glutathionylés. En effet, les précurseurs cystéinylés sont majoritairement présents dans les trois premières fractions (0, 5 et 10 % de méthanol, Figure 1A) alors que le 3SH est plus concentré lors de la fermentation de la fraction élue par une solution de méthanol à 15 % (Figure 2). La teneur en 3SH dans la modalité 15% pourrait s'expliquer par la présence du Pgsh3SH. Celui-ci semble donc participer également à la libération de ce thiol volatil, mais il apparaît clairement que son taux de biotransformation est bien inférieur à celui du précurseur cystéinylé. En effet, la fraction 15% présente une teneur en Pgsh3SH dix fois plus élevée que celle en Pcys3SH de la fraction 5%, pourtant la teneur en 3SH libéré est identique (Figure 2).

En revanche, pour la fraction 10%, la libération de 3SH est importante alors que la teneur en précurseurs cystéinylés et glutathionylés est relativement faible et ne permet pas d'expliquer la quantité de 3SH libéré. Il est alors possible qu'un ou plusieurs autres composés responsables d'une partie de la libération des thiols volatils soient présents dans cette fraction.

Cette première approche semble donc indiquer que d'autres formes de précurseurs d'arôme pourraient exister dans le moût et participer à la libération du 3SH. Cependant, cette technique de fractionnement doit être améliorée ; il faudrait pouvoir percoler un volume de moût beaucoup plus important permettant de purifier voire, d'identifier les précurseurs inconnus.

Les optimisations de fractionnement ont porté sur différentes étapes du protocole préalablement décrit par Darriet (1993) et Tominaga (1998) telles que le choix de la nature de l'adsorbant, le volume optimal de moût à purifier, ou encore des tests de répétabilité de la technique.

II. Optimisation des conditions de fermentation

L'étape essentielle à la mise en évidence de nouvelles formes précurseurs d'arômes est la fermentation alcoolique. Cette étape clé, réalisée par *Saccharomyces cerevisiae*, est bien sûr essentielle à toutes vinifications mais elle est primordiale dans la libération des arômes tels que les thiols volatils. Ces derniers sont ainsi révélés par le métabolisme des levures à partir de formes précurseurs contenues dans le moût. L'objectif principal de ce travail étant d'identifier de nouveaux composés à l'origine de la libération du 3-sulfanylhéxanol dans les vins, nous considérerons dans un premier temps, la fermentation comme une simple étape nous permettant d'accéder au potentiel en 3SH du moût. Toutefois, celle-ci se doit d'être rapide, totale et reproductible.

Afin de gagner en reproductibilité et en temps, nous avons étudié l'influence de la teneur en sucres des milieux modèles.

Différents milieux sont fermentés avec des teneurs variables en sucres et supplémentés en précurseurs cystéinylés (60µg/L) et glutathionylés (120µg/L).

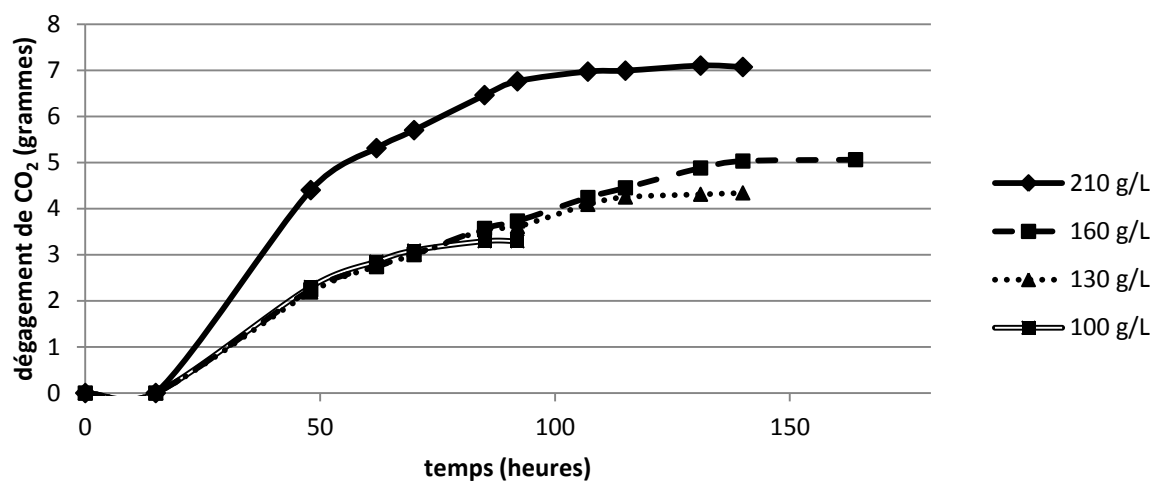


Figure 3 : Cinétique de fermentation en fonction de la teneur initiale en sucre du milieu modèle (210 g/L, 160g/L, 130g/L et 100g/L de sucres)

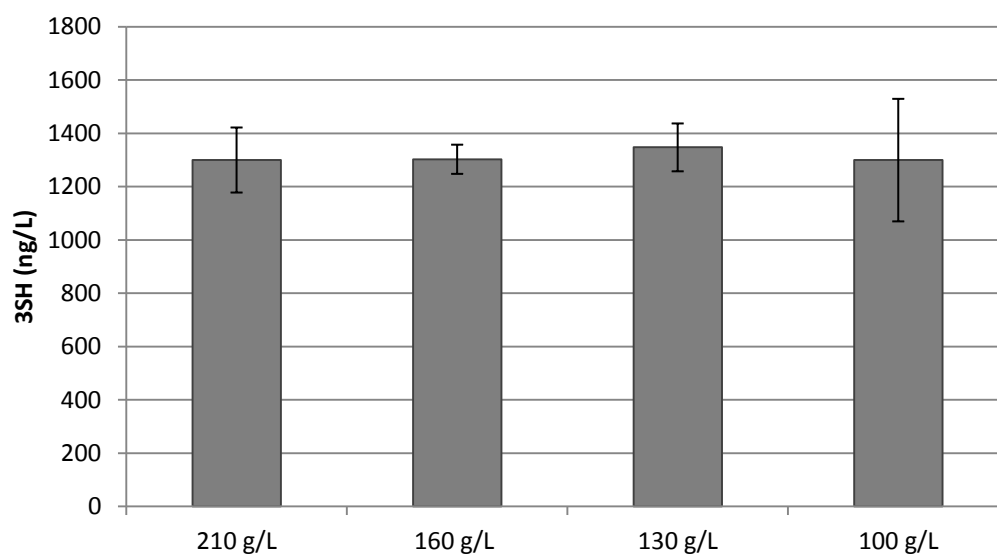


Figure 4 : Libération de 3SH après fermentation alcoolique en milieu modèle contenant 210g/L, 160g/L, 130g/L et 100g/L de sucres (n=2)

Comme attendu, le temps de fermentation est réduit lorsque le milieu modèle ne contient que 100g/L de sucres (115h pour le témoin contenant environ 210g/L de sucres et 80-85h pour le milieu modèle à 100g/L), permettant ainsi un gain de temps considérable (Figure 3). Un dosage du 3SH est alors nécessaire pour valider l'absence d'impact d'une concentration plus faible en sucres sur la révélation du 3SH.

Le dosage du 3SH libéré après fermentation est équivalent selon la quantité de sucres présents dans le milieu (Figure 4). La concentration en sucres dans le milieu modèle ne modifie donc pas la libération de 3SH. Ainsi, pour la suite des manipulations, chaque fermentation en milieu modèle se fera à des concentrations de 100g/L permettant ainsi de réaliser des microvinifications reproductibles, en 3 ou 4 jours.

III. Optimisation du protocole de fractionnement du moût

1) Optimisation de la nature de l'adsorbant pour le fractionnement des moûts

Dans un premier temps, deux natures d'absorbant ont été testées ; les capacités de la silice greffée en C₁₈ (Chromatographiegel C-Gel C-18 C-560) ont été comparées à deux résines de type Amberlite® XAD (copolymère de styrène-divinylbenzène ou polymère aromatique réticulé macroréticulaire ; XAD-2 ou XAD-4, Supelco), très souvent utilisées dans l'extraction ou la purification de composés en matrice chargée (Barbe *et al.*, 2008 ; Cai *et al.*, 2013 ; Cinelli *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2014 ; Zhong *et al.*, 2014 ; Zhou *et al.*, 1996).

Chaque résine (50g) préalablement mises en suspension dans du méthanol est coulée dans une colonne SPE (empty SPE tubes PP 100mL, Interchrom) reliée à un système de vide (VacElut 20 Manifold, Varian). Après conditionnement par 300 mL de méthanol et 300 mL d'eau, 150 mL de moût préalablement centrifugé (soit un volume moyen de 3 mL par gramme de résine) sont percolés. La colonne est ensuite rincée par 100 mL d'eau afin d'éliminer les composés non retenus sur la résine tels que les sucres ou les acides du moût.

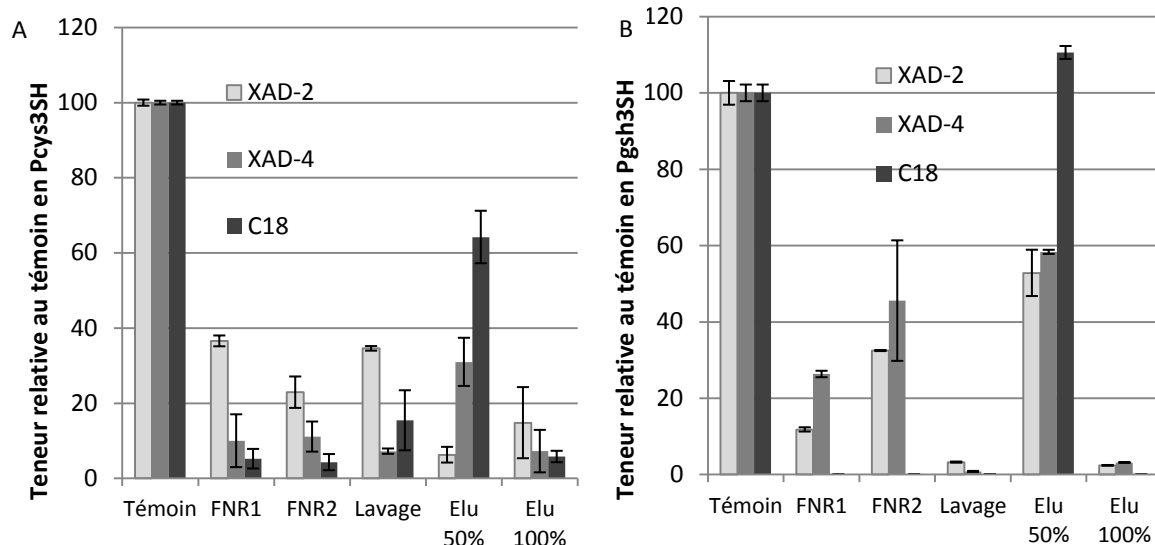


Figure 5 : Dosage des précurseurs cystéinylés (A) et glutathionylés (B) dans les fractions obtenues par percolation du moût sur XAD-2, XAD-4 ou C₁₈. Témoin : moût témoin non percolé. FNR1 : fraction non retenue correspondant à 1,5 mL de moût percolé par gramme d'adsorbant. FNR2 : fraction non retenue correspondant à 1,5 mL de moût supplémentaire percolé par gramme d'adsorbant. Lavage, Elu 50% et Elu 100% correspondent à chaque palier d'élution collecté (n=2)

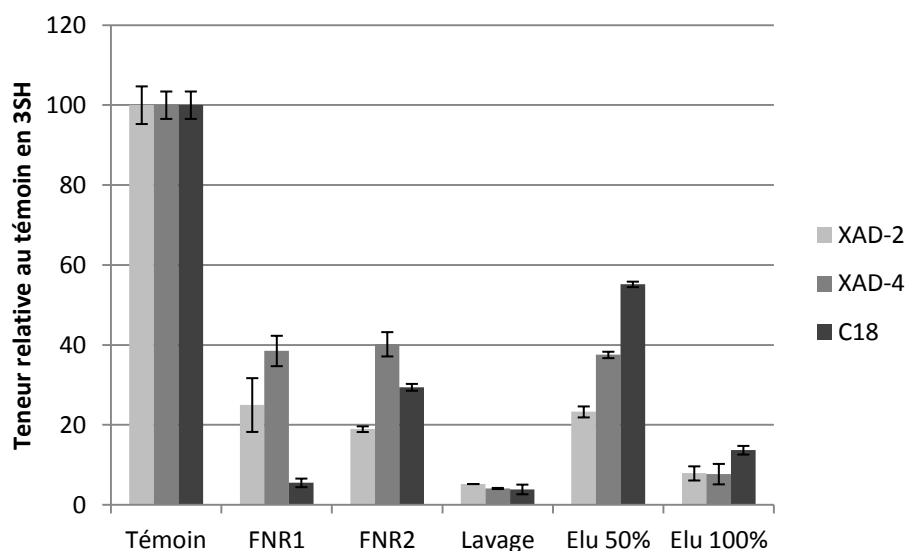


Figure 6 : Dosage du 3SH libéré après fermentation des fractions obtenues par percolation du moût sur XAD-2, XAD-4 ou C₁₈. Témoin : moût témoin non percolé. FNR1 : fraction non retenue correspondant à 1,5 mL de moût percolé par gramme d'adsorbant. FNR2 : fraction non retenue correspondant à 1,5 mL de moût supplémentaire percolé par gramme d'adsorbant. Lavage, Elu 50% et Elu 100% correspondent à chaque palier d'élution collecté (n=2)

L'élution est réalisée par deux solutions à concentrations croissantes en méthanol (50 et 100%, 300 mL). Les fractions non retenues (FNR) sont directement mises à fermenter alors que la fraction de lavage est préalablement concentrée deux fois et additionnée à du milieu modèle. Enfin, les fractions d'élution sont évaporées à sec, lyophilisées puis mises à fermenter. Avant ensemencement, un prélèvement est réalisé afin de déterminer la teneur en Pcys3SH et Pgsh3SH. Une fois la fermentation achevée, le 3SH libéré est analysé comme précédemment.

Concernant les résultats obtenus avec les résines Amberlite® XAD-2 et XAD-4, il apparaît clairement que la distribution des précurseurs au cours de la purification est dépendante de la forme considérée et de la nature de la résine (Figure 5). En effet, dans le cas de l'utilisation de l'Amberlite® XAD-2, la majeure partie des précurseurs cystéinylés est présente dans les fractions non retenues et de lavage alors qu'ils sont retrouvés en majorité dans les fractions d'élution sur XAD-4. En revanche, la distribution du Pgsh3SH est assez similaire sur les deux résines, mais plus de 50 % de ce composé est retrouvé dans les FNR. L'absence de celui-ci dans la fraction de lavage semble indiquer qu'il est bien retenu sur les XAD-2 et XAD-4, à l'inverse du Pcys3SH, mais qu'une saturation de la colonne a été engendrée par la percolation d'un volume trop important de moût.

L'utilisation de la silice greffée en C₁₈ donne de très bons résultats. En effet, la quasi-totalité du Pcys3SH et du Pgsh3SH est adsorbée sur la colonne avant d'être élue spécifiquement par le méthanol à 50 %.

Le dosage des thiols volatils en fin de fermentation des fractions issues des résines Amberlite® XAD-2 et XAD-4 (Figure 6) montre une forte libération du 3SH à partir de la fraction d'élution à 50% de méthanol, cependant, la libération de 3SH à partir des FNR et du lavage est également importante (33 % du témoin dans FNR1 ; 20% et 10% respectivement dans FNR2 et lavage de la colonne XAD-2), ce qui semble confirmer la saturation de la résine préalablement observée au niveau des précurseurs.

La percolation du moût sur C₁₈ entraîne une forte atténuation de la libération du 3SH (concentration dans la FNR inférieure à 25 % du témoin) alors que l'addition de la fraction d'élution 50 % dans le milieu modèle de fermentation conduit à une libération de 3SH représentant environ 50% de celle du témoin.

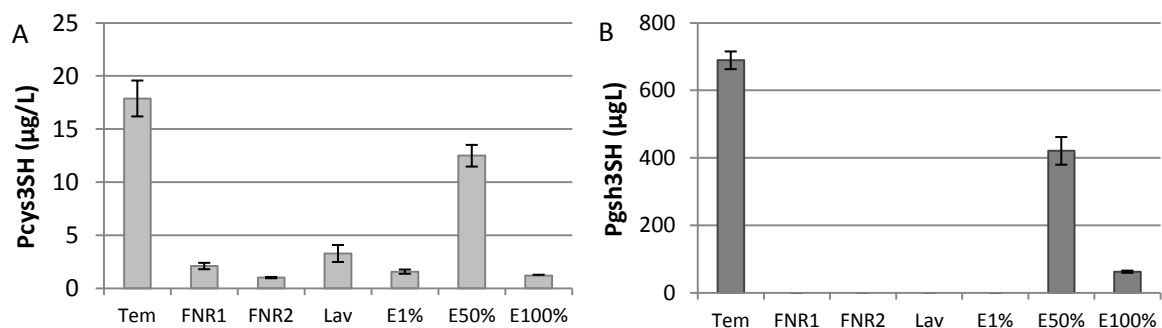


Figure 7 : Dosage des précurseurs cystéinylés (A) et glutathionylés (B) dans les fractions obtenues par percolation du moût sur C₁₈. Témoin : moût témoin non percolé. FNR1 : fraction non retenue correspondant à 3 mL de moût percolé par gramme d'adsorbant. FNR2 : fraction non retenue correspondant à 3 mL de moût supplémentaire percolé par gramme d'adsorbant. Lavage, Elu 1%, Elu 50% et Elu 100% correspondent à chaque palier d'élution collecté (n=2)

Ainsi, il apparaît que les deux résines Amberlite® XAD-2 et XAD-4 testées ne sont pas adaptées à la purification partielle des moûts en vue du fractionnement des précurseurs, en particulier à cause d'une faible capacité de charge. En revanche, nous confirmons que la silice greffée en C₁₈ semble parfaitement adaptée à la purification des composés précurseurs du 3SH déjà connues et/ou à découvrir.

2) Détermination de la capacité de charge maximum

Dans cette partie, nous avons cherché à déterminer le volume de moût maximal percolable sur une quantité donnée de C₁₈, en d'autres termes à déterminer la capacité de charge maximale de la colonne. Précédemment, nous avons vu que la percolation de 3mL de moût par gramme de silice n'entraîne qu'une faible perte de composés précurseurs dans les FNR. En effet, seul 20% du 3SH libéré est retrouvé dans ces fractions, ce qui indique que la majorité des précurseurs connus ou inconnus est adsorbée par la C₁₈. Nous pouvons donc penser qu'il est envisageable d'augmenter le volume de moût sans pour autant saturer la résine.

Dans cet essai, nous avons également ajouté un palier d'élution supplémentaire à 1% de méthanol pour tenter de fractionner plus finement les précurseurs.

Le dosage des précurseurs présents dans les différentes fractions indique la présence de précurseurs cystéinylés dans les FNR et le lavage, mais en faibles concentrations (Figure 7A). De plus, les précurseurs glutathionylés sont absents de ces fractions (Figure 7B). Il semblerait donc qu'en doublant les proportions de moût percolé par gramme de silice, il n'y ait pas de modification du profil d'élution. La silice ne serait donc pas saturée pour ces volumes testés.

Par ailleurs, la percolation d'une solution à 1% de méthanol ne semble pas suffisante pour décrocher les précurseurs de la C₁₈. En effet, ils sont présents presque en totalité dans la fraction d'élution à 50% de méthanol.

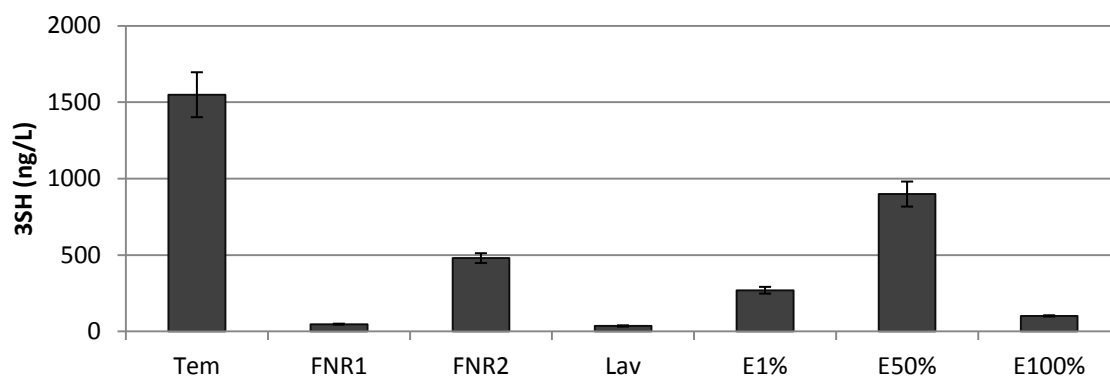


Figure 8 : Dosage du 3SH libéré après fermentation des fractions obtenues par percolation du moût sur C₁₈. Témoin : moût témoin non percolé. FNR1 : fraction non retenue correspondant à 1,5 mL de moût percolé par gramme d'adsorbant. FNR2 : fraction non retenue correspondant à 1,5 mL de moût supplémentaire percolé par gramme d'adsorbant. Lavage, Elu 50% et Elu 100% correspondent à chaque palier d'élution collecté (n=2)

Tableau 10 : Teneur relative en 3SH libéré après fermentation alcoolique des fractions d'élution. 100% correspond à la teneur moyenne du témoin non percolé

		FNR	Lav	Elu 100%
Cgel C ₁₈	1 ^e utilisation	1,9% ±0,4	20,8% ±0,7	88,2% ±1,0
	2 ^e utilisation	2,1% ±0,6	19,3% ±2,3	67,7% ±8,4
	3 ^e utilisation	2,6% ±0,5	23,8% ±2,0	83,4% ±1,2
PuriFlash C ₁₈	1 ^e utilisation	3,8% ±1,8	15,1% ±1,8	79,4% ±3,1
PolygoPrep C ₁₈	1 ^e utilisation	2,3% ±0,5	5,5% ±1,1	85,1% ±12,4

Le dosage du 3SH en fin de fermentation montre que la fraction d'élution à 50% de méthanol contenant au départ la majeure partie des précurseurs connus, libère une forte concentration de 3SH (Figure 8). Cependant, il apparaît que la fermentation de la fraction non retenue FNR2, contrairement à la FNR1, conduit à une libération de 3SH alors que la teneur initiale en Pcys3SH et Pgsh3SH était limitée. Il en est de même pour la fraction E1%. Ces observations semblent confirmer l'existence de formes précurseurs inconnues dans les moûts.

Le fait que la teneur en 3SH libéré à partir des FNR augmente avec le volume de moût percolé pourrait dénoter d'une saturation de la colonne gênant la fixation des composés potentiellement précurseurs d'arôme (CPPA). De ce fait, pour la poursuite du projet, nous choisissons de conserver un ratio volume de moût percolé par gramme de résine égal à 3.

3) Incidence de l'origine et de l'utilisation répétée de la résine

Les essais préliminaires ont été réalisés avec un lot de C₁₈ déjà existant au laboratoire avant le début de ce projet. Le fournisseur n'existant plus nous avons comparé la silice greffée préalablement utilisée (Chromatographiegel C-Gel C₁₈ C560, All Tech) à deux lots d'origines différentes (PuriFlash IR 100 C₁₈, Interchrom et Polygoprep 60-30 C₁₈ non encapped, Macherey Nagel). Par ailleurs, nous sommes intéressés à l'impact de la réutilisation de la résine et donc de sa régénération sur les capacités de charge, la résolution et la répétabilité. Pour cela, un lot de silice greffée en C₁₈ est régénéré au méthanol après une première utilisation (5 fois son volume) avant d'être reconditionné. Dans cet essai, 150mL de moût sont percolés sur 50g de silice, lavés à l'eau et élués au méthanol.

D'après les résultats présentés dans le Tableau 10, il est possible d'observer dans un premier temps l'impact de la réutilisation de la C₁₈ sur la purification des composés précurseurs d'arômes. Il apparaît clairement que la C₁₈ fixe de manière aussi efficace les composés précurseurs d'arômes au fur et à mesure des utilisations car la libération de 3SH dans les fractions d'élution est stable (88,2% pour une utilisation, 67,7% lors de la deuxième utilisation et 83,4% lors de la troisième utilisation). De plus, il semblerait qu'il n'y ait pas

d'adsorption irréversible de composés non précurseur sur la colonne qui ne seraient pas éliminés par le reconditionnement. En effet, la libération en 3SH des fractions non retenues est très proche (1,9% pour une utilisation, 2,1% pour deux utilisations, et 2,6% pour trois utilisations).

D'autre part, un comparatif entre les lots a été réalisé. Il s'avère que les trois lots de C₁₈ présentent les mêmes caractéristiques d'adsorptions du Pcys3SH et du Pgsh3SH (résultats non présentés) et du potentiel en 3SH. En effet, la perte dans les FNR représente environ 20% du 3SH total. Cette valeur est comparable selon les résines (23%, 19% et 8% respectivement pour les résines Cgel C₁₈, PuriFlash C₁₈ et PolygoprepC₁₈).

En conclusion, il semblerait que l'ensemble des C₁₈ testées présentent les mêmes caractéristiques, et qu'il est possible de reconditionner la résine.

4) Optimisation du gradient d'élution

Lors des essais précédents, nous avons observé que la fraction obtenue par l'élution de la colonne par 1% de méthanol pouvait conduire à une libération de 3SH sans pour autant renfermer beaucoup de formes connues de précurseur d'où sa dénomination de fraction potentiellement précurseur d'arôme (FPPA). Ainsi, les composés potentiellement précurseurs d'arômes sont moins bien fixés que les formes connues, il est donc envisageable de les décrocher avec un pourcentage en méthanol plus faible. Il sera alors possible de séparer les formes potentiellement précurseur des formes connues en affinant le gradient d'élution.

De plus, il semblerait qu'une élution à 50% de méthanol suffise à décrocher les composés précurseurs. Il serait donc intéressant de tester des pourcentages en méthanol plus faibles afin de simplifier la composition des FPPA et des FPA.

Dans cet essai, différentes proportions en méthanol sont utilisées pour éluer les composés d'intérêt (1%, 30% et 100%). Le volume de moût percolé correspond toujours à 3mL/gramme de silice greffée C₁₈.

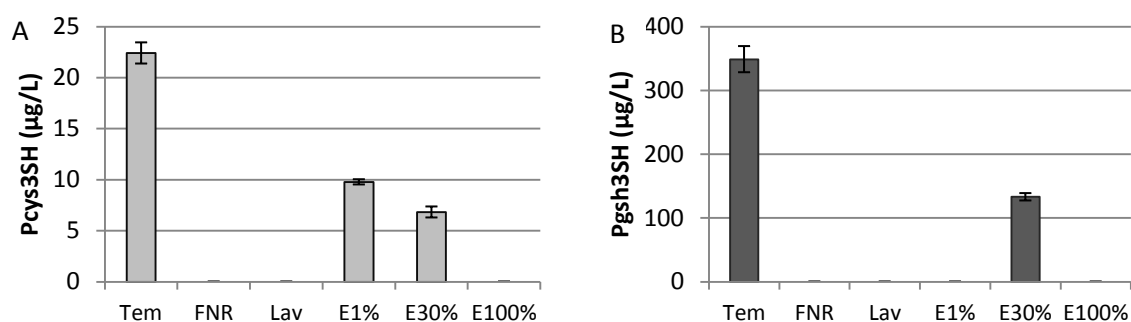


Figure 9 : Dosage des précurseurs cystéinylés (A) et glutathionylés (B) dans les fractions obtenues par percolation du moût sur C₁₈. Témoin : moût témoin non percolé. FNR : fraction non retenue correspondant à 3 mL de moût percolé par gramme d'adsorbant. Lavage, Elu 1%, Elu 30 % et Elu 100% correspondent à chaque palier d'élution collecté (n=2)

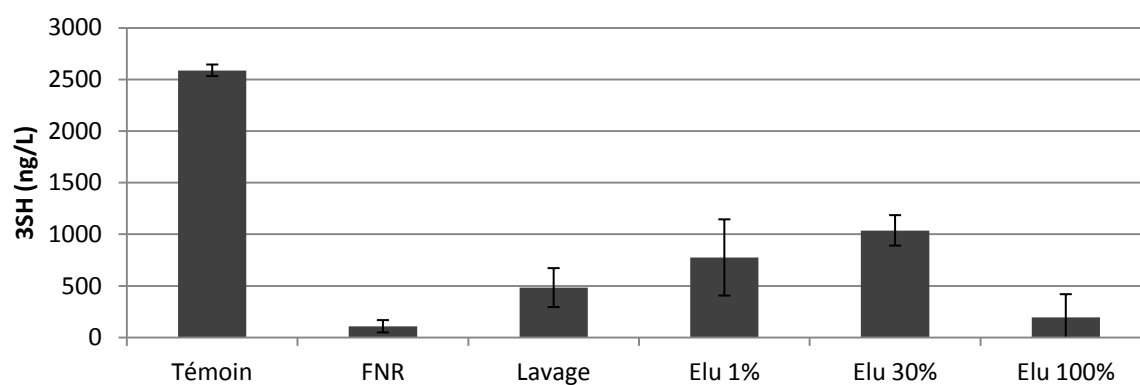


Figure 10 : Dosage du 3SH libéré après fermentation des fractions obtenues par percolation du moût sur C₁₈. Témoin : moût témoin non percolé. FNR : fraction non retenue correspondant à 3 mL de moût percolé par gramme d'adsorbant. Lavage, Elu 1%, Elu 30 % et Elu 100% correspondent à chaque palier d'élution collecté (n=2)

Le dosage des précurseurs (Figure 9) indique que, contrairement à la Figure 7, plus de 50% des précurseurs cystéinylés sont présents dans la fraction d'élution à 1% de méthanol. Dans cet essai, il semblerait que l'élution par une solution à 1% de méthanol suffise à décrocher les Pcys3SH. De plus, il apparaît que l'ensemble des précurseurs connus sont élués par une solution à 30% de méthanol.

La distribution du 3SH libéré après fermentation alcoolique de ces fractions est présentée dans la Figure 10. Celui-ci est majoritairement retrouvé « dans » les fractions d'élution à 1% et à 30% de méthanol, qui correspondent à celles contenant les formes précurseurs connues (Pcys3SH et Pgsh3SH). La fraction éluee par 100% de méthanol génère peu de 3SH après fermentation alcoolique. Ainsi, l'ensemble des composés précurseurs de 3SH sont à priori décrochés par 30% de méthanol.

En conclusion, le ratio optimal de percolation est de 3mL de moût par gramme de C₁₈, ce qui prévient une perte de composés potentiellement précurseurs d'arômes dans les fractions non retenues et de lavage. Enfin, 30% de méthanol sont suffisants pour décrocher l'ensemble des composés précurseurs d'arômes alors qu'1% de méthanol conduit à des résultats variables ; selon les essais, ceux-ci sont plus ou moins contaminés par le précurseur cystéinylé.

Il est donc primordial de valider la répétabilité de la technique en vue de fractionner et d'isoler les précurseurs potentiellement précurseurs d'arômes des formes connues.

5) Contrôle de la répétabilité de la méthode

La répétabilité de la méthode a été déterminée sur plusieurs tests indépendants réalisés en condition similaire (nature de la C₁₈, origine du moût, volume de percolation, palier d'élution,...) à quelques semaines d'intervalle. A titre d'exemple, seuls les résultats de trois des fractionnements sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Fractionnement des précurseurs de 3SH d'un moût de Sauvignon par chromatographie sur SPE C₁₈. Teneurs en Pcys3SH et Pgsh3SH dans les fractions séparées (en % de leur teneur dans le moût). Teneurs en 3SH libéré après fermentation alcoolique par les fractions séparées (en % de la teneur en 3SH du moût fermenté). FNR : Fractions non retenues. 1% correspond à une élution à 1% de méthanol. 100% correspond à une élution à 100% de méthanol

		FNR	Lavage	Fractions d'élution	
				1% de méthanol	100% de méthanol
Test n°1	Pcys3SH	0	0	44,5% ±1,1	31,1% ±2,4
	Pgsh3SH	0	0	0	38,2% ±1,6
	3SH	4,2% ±2,3	18,7% ±7,3	14,9% ±7,1	57,9% ±7,2
Test n°2	Pcys3SH	0	0	9,1%	60,3%
	Pgsh3SH	0	0	0,01%	39,4%
	3SH	7,5% ±3,7	13,0% ±3,7	60,3%	22,2% ±3,2
Test n°3	Pcys3SH	0	0	0	83,8% ±0,6
	Pgsh3SH	0	0	0	88,7% ±5,5
	3SH	0	15,4% ±3,8	15,4% ±3,8	51,9% ±8,7

L'analyse des formes précurseurs corrélée à la libération du 3SH après fermentation dénote une forte instabilité dans le protocole. En effet, la FPPA obtenue par élution de la colonne par une solution de méthanol à 1% peut contribuer jusqu'à 60 % du 3SH total (test 2) contre 15% dans les tests 1 et 3. De plus, elle est facilement contaminée par du Pcys3SH. Malgré cela, il est intéressant de noter que la variation observée sur le 3SH ne peut pas être expliquée à elle seule par la présence ou l'absence des précurseurs cystéinylés (seulement 9% décrochés par 1% de méthanol). Il est alors fortement probable qu'un autre composé explique en partie cette forte libération. Enfin, la libération de 3SH « dans » les fractions d'élution à 100% de méthanol est corrélée à celle à 1% de méthanol. En effet, une libération en 3SH importante « dans » les fractions d'élution à 1% indique qu'une forte proportion de composés précurseurs d'arômes sont présents, d'où une plus faible libération possible « dans » la fraction d'élution restante à 100% de méthanol.

IV. Conclusion

En conclusion, le fractionnement sur C_{18} a permis de mettre en évidence l'existence d'un ou de plusieurs composés inconnus dans le moût pouvant expliquer une partie de la libération du 3SH. En effet, certaines fractions qui ne contiennent pas de précurseurs cystéinylés et glutathionylés sont capables de générer du 3SH lorsqu'elles sont ajoutées à un milieu modèle de fermentation. Cependant, cette approche ne semble pas assez reproductible pour les isoler bien qu'elle permette une purification partielle des composés précurseurs. En effet, quel que soit l'essai, la majorité des composés précurseurs d'arômes sont fixés sur la C_{18} , la perte de composés précurseurs dans les fractions non retenues et de lavage est donc faible. Cette méthode est alors adaptée à l'obtention d'un extrait (fraction d'élution) contenant la majorité des composés précurseurs d'arômes tout en étant dépourvu de sucres (présents dans les fractions non retenues et de lavage). Cependant, il semble que le fractionnement de l'extrait (fraction d'élution avec pourcentage variable en méthanol) soit aléatoire et qu'il n'est pas envisageable de transposer cette méthode en gros volume. Ceci pourrait très certainement s'expliquer par une mauvaise maîtrise du gradient d'élution et à une adsorption faible des CPPA sur la silice greffée en C_{18} . Ainsi la mise en évidence directe de nouvelles formes par cette technique nous semble compromise. De plus, cette

technique est très chronophage pour obtenir une purification seulement partielle. Il est donc primordial de mettre au point une technique de purification complémentaire qui permettra à terme de séparer plus rapidement les différentes formes précurseurs.

CHAPITRE 4 : NOUVELLE APPROCHE DE PURIFICATION DES MOULTS PAR CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE (CPC)

La CPC est une technique de chromatographie liquide-liquide dite hydrostatique sans phase stationnaire solide. La colonne CPC est constituée d'un empilement de disques en acier inoxydable dans lesquels sont gravées des cellules de partage reliées entre-elles par des capillaires. Quand la colonne est mise en rotation le champ de force centrifuge maintient la phase stationnaire liquide au sein de la colonne. La phase dite mobile, quant à elle, est pompée au travers de la phase stationnaire liquide. Elle repose sur le principe de l'ampoule à décanter. Ces principaux avantages techniques sont une grande répétabilité, une grande capacité de charge et une sélectivité importante grâce au ratio de phase stationnaire utile / phase mobile important et à une large diversité de systèmes solvant et de stratégie d'élution.

Par l'utilisation de cette technique, nous espérons pouvoir fractionner plus finement le potentiel en 3SH du moût. En effet, la séparation des constituants d'un mélange repose sur le mode de partage spécifique de chaque composé dans le système solvant utilisé. Ainsi, le large choix de phase stationnaire et mobile disponible rend possible la séparation fine d'une large palette de composés.

Le choix du système de solvants est l'étape primordiale pour un fractionnement optimal en CPC. Il doit permettre une répartition équitable des composés d'intérêt entre les deux phases liquides du système, et ainsi le différencier des autres composés ayant des affinités différentes pour les deux phases. Des tests préliminaires sont alors indispensables pour sélectionner le système de solvants le plus adapté.

Cependant, puisqu'il n'est pas possible de sélectionner un système de solvants pour nos composés précurseurs inconnus, nous avons choisi de le développer en nous basant sur les formes cystéinyliées et glutathionyliées. Nous avons supposé que les composés potentiellement précurseurs d'arôme (CPPA), présentaient une structure proche des formes déjà identifiées puisqu'ils conduisent tous après fermentation au 3SH. De plus, nous avons vu précédemment que les CPPA semblaient présenter une polarité similaire voir légèrement

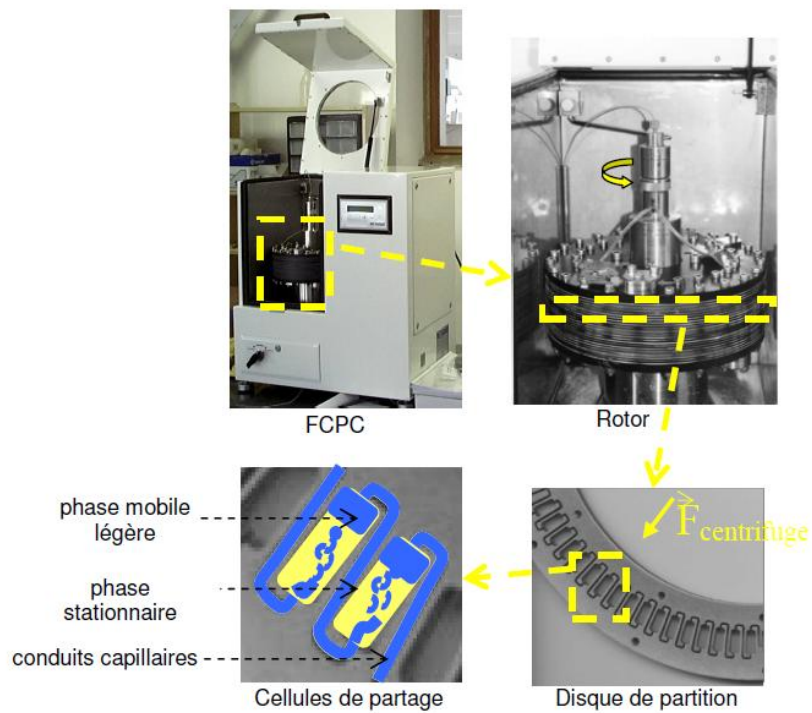


Figure 11 : Schéma descriptif d'un 'appareil de chromatographie de partage centrifuge (CPC) (d'après Toribio, 2007)

plus élevée que le Pcys3SH. Ces observations nous laissent supposer que leur comportement au cours des étapes de purification sont similaires.

I. Principe générale de la CPC

1) Notion de base

La technique de chromatographie de partage centrifuge (CPC) est le fruit des recherches de Nunogaki en 1982. Dénommée précédemment HSCCC, cette technique a pu être utilisée pour purifier des triterpénoïdes (Lee *et al.*, 1990) ainsi que des polyphénols du vin (Degenhardt *et al.*, 2000). Cette technique de chromatographie liquide-liquide sans support solide est basée sur les différences de partage des solutés entre deux phases liquides non miscibles préparées par mélange de deux solvants ou plus.

Une phase liquide est maintenue stationnaire dans la colonne (rotor) par un champ de force centrifuge constant. Ce champ de force est généré par la mise en rotation d'une colonne contenant des cellules de partage ; ces dernières étant reliées entre elles par des conduits de section inférieure à celle des cellules de partage. L'autre phase liquide dite « mobile » est-elle pompée au travers de la phase stationnaire. Ces deux phases exercent des effets opposés sur les composés : la phase mobile les entraîne et à l'inverse la phase stationnaire les retient. Ainsi, les solutés d'un mélange sont séparés en fonction de leurs affinités (coefficients de partage respectifs) pour les deux phases liquides (Figure 11).

L'échantillon à analyser est dissout dans un mélange des deux phases et injecté dans le système. L'élution des composés est réalisée par la phase mobile qui est pompée au travers de la phase stationnaire. Les solutés se répartissent alors dans les deux phases en fonction de leurs affinités pour chacune d'elles, et migrent donc à leur propre vitesse selon l'équation suivante :

$$\text{avec } \frac{V_r}{V_{mob}} = \frac{V_{stat}}{V_{mob}} + K_D$$

Où V_r correspond au volume de rétention du composé ; V_{mob} , au volume de phase mobile dans la colonne ; V_{stat} , au volume de phase stationnaire retenu dans la colonne et K_D , le coefficient de partage liquide-liquide du soluté considéré c'est-à-dire le rapport de la concentration du soluté dans la phase stationnaire sur la concentration du soluté dans la

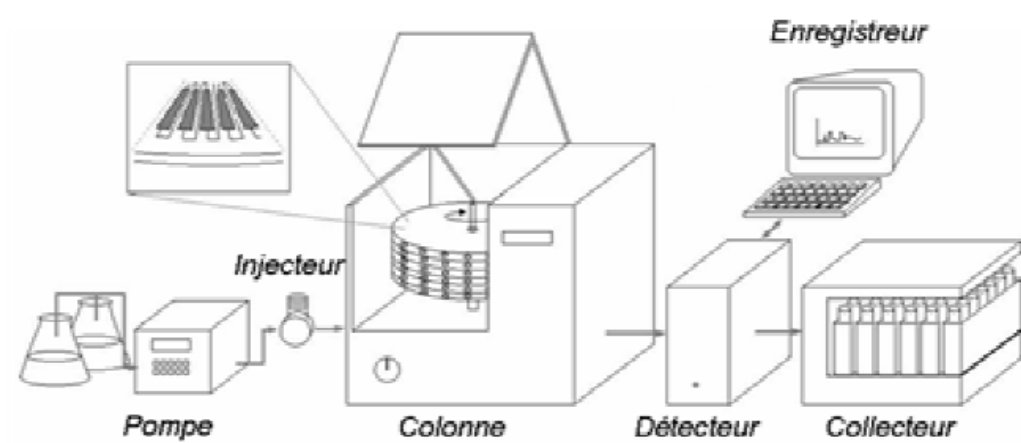


Figure 12 : Schéma d'une chaîne de CPC (d'après Toribio, 2007)

phase mobile. D'après cette relation, un composé possédant un K_D proche de 1 sera élué de la colonne au bout d'un volume de colonne. En revanche, des composés possédant des $K_D < 1$ (forte affinité avec la phase inférieure) ou des $K_D > 1$ (forte affinité pour la phase supérieure) seront respectivement élués avant et après un volume de colonne. En CPC, il est donc préférable que les valeurs de K_D soient comprises entre 0.5 et 1 afin que les molécules soient séparées en un volume de colonne sans consommation excessive de solvants. Cependant, un K_D inférieur à 2 peut être accepté car il permet toujours une séparation en un temps raisonnable. Les K_D des composés d'un échantillon doivent bien évidemment être différents pour pouvoir les séparer. Il y a donc nécessité de calculer les coefficients de partage des composés d'intérêt dans le système de solvants choisi afin de savoir si la séparation par CPC est réalisable.

La méthode d'élution-extrusion consiste à pousser, en fin d'analyse, la phase stationnaire liquide hors de la machine tout en conservant la séparation des solutés initiée dans la phase stationnaire par la phase d'élution initiale.

L'utilisation d'appareil CPC permet d'inverser facilement le sens de pompage de la phase mobile via une vanne 4 voies située avant la colonne. Lorsque la phase stationnaire est la plus dense, la phase mobile est alors pompée en mode ascendant à contre sens du champ de force centrifuge. Au contraire, lorsque la phase stationnaire est la plus légère la phase mobile est introduite dans le sens du champ de force centrifuge, on parle alors de mode descendant.

La chaîne chromatographique utilisée en CPC est constituée d'une pompe quaternaire, d'une boucle d'injection, d'une colonne CPC (rotor), d'un détecteur UV-DAD et d'un collecteur de fraction (Figure 12).

2) Choix du système de solvants

Le choix d'un système de solvants biphasique adéquat est l'étape la plus importante pour la réussite d'une bonne séparation des composés.

La polarité de l'échantillon, sa solubilité ainsi que sa charge influent ce choix. De plus, il est nécessaire de tenir compte des propriétés du système de solvants, telles que sa viscosité ou sa masse volumique. En effet, le système ne doit pas être déstabilisé par l'injection de

l'échantillon. Tout cela doit permettre un bon transfert de matière entre les deux phases et une rétention suffisante de la phase stationnaire.

L'objectif est donc de déterminer la meilleure combinaison de solvants (bonne solubilité de l'échantillon, coefficient de partage proche de 1, et proportions équitables entre les deux phases) pour obtenir une séparation optimale.

3) Avantages à l'utilisation de la CPC

Il existe de nombreux avantages à l'utilisation de la chromatographie de partage centrifuge :

- L'absence d'un support solide permet d'éviter les adsorptions irréversibles des solutés comme il peut exister en CLHP. Ainsi, la totalité de l'échantillon est récupérée.
- Un choix quasi-illimité de système de solvants est possible ce qui permet d'adapter cette technique à de multiples cas. De plus, la CPC permet une faible consommation de solvants par rapport aux autres méthodes de chromatographie préparative, ce qui constitue des enjeux environnementaux et économiques non négligeables.
- Cette technique peut parfaitement être utilisée à l'échelle préparative car sur une colonne de 1L, il est possible d'injecter jusqu'à 10g d'échantillon.
- Enfin, le temps de manipulation relativement court (de 1 à 3 heures), permet l'obtention rapide de résultats.

II. Etude de la faisabilité de l'extraction des précurseurs par CPC

La première étape lors d'un fractionnement par CPC est la sélection du système de solvant le plus adapté. Afin d'orienter nos essais CPC, des tests d'extractions sur le moût ont été réalisés. Sachant que les formes précurseurs connues sont des composés en C₆ liés à un acide aminé ou à un tri-peptide, le choix des solvants s'est placé dans une gamme de polarité assez élevée.

1) Extractibilité des précurseurs par différents solvants

Dans cet essai, nous avons évalué la capacité de deux solvants pour l'extraction du potentiel en 3SH du moût : le butanol et l'acétate d'éthyle.

Pour cela, le moût est extrait par trois extractions successives au butanol (Figure 13) ou à l'acétate d'éthyle (Figure 14). Les phases organiques ont été rassemblées, séchées au sulfate de sodium avant d'être concentrées à sec. Les phases aqueuses ont également été en partie évaporées afin d'éliminer les traces de solvants.

Il apparaît que l'extraction successive du moût par 3 volumes de butanol (Figure 13) a permis d'extraire 50 % des formes précurseurs, tandis que la majorité des sucres (98%) restent en phase aqueuse. En revanche, lors de l'extraction à l'acétate d'éthyle (Figure 14), seulement quelques pourcents des formes précurseurs sont extraits.

Les résultats présentés dans la Figure 13, suggèrent donc la possibilité d'utiliser le butanol comme solvant d'extraction.

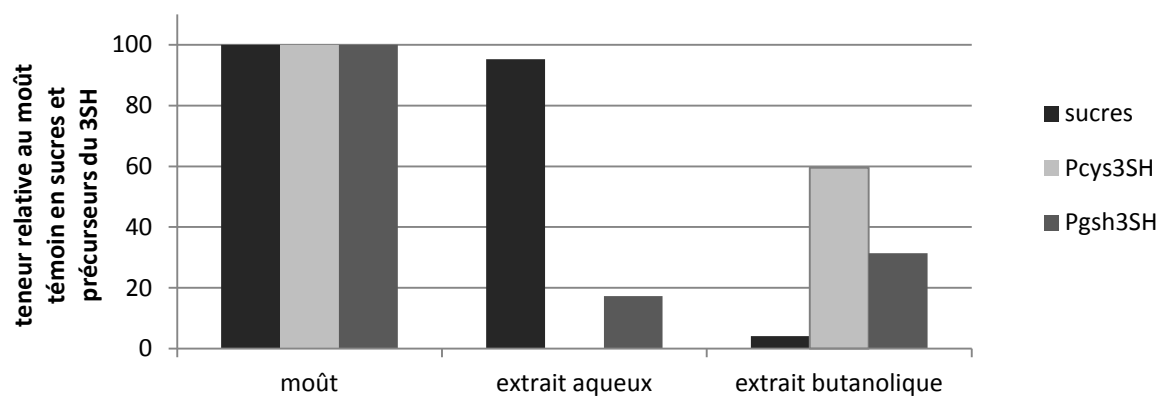


Figure 13 : Localisation et quantification des sucres et formes précurseurs du 3SH dans les fractions issues de l'extraction d'un moût (10mL) au butanol (10/10/10)

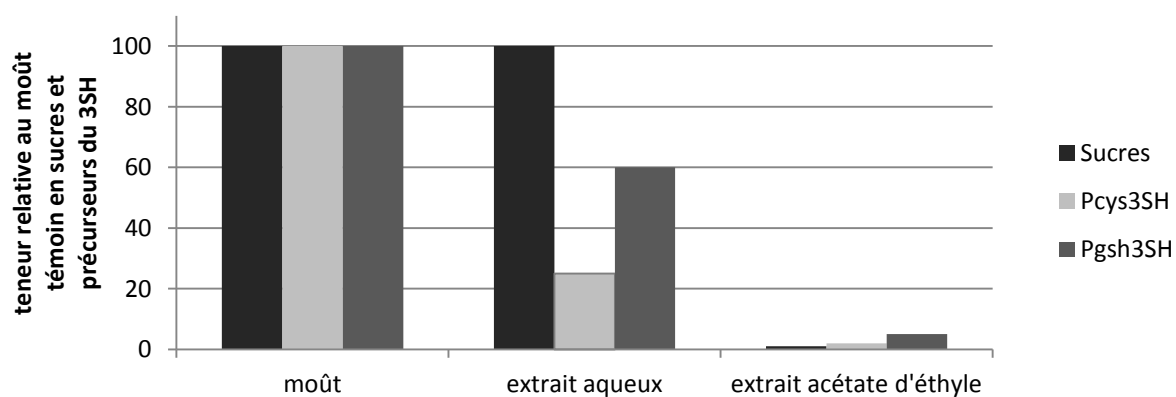


Figure 14 : Localisation et quantification des sucres et formes précurseurs du 3SH dans les fractions issues de l'extraction d'un moût (10mL) à l'acétate d'éthyle (10/10/10)

2) Détermination du coefficient de partage du potentiel en 3SH des moûts

La seule analyse des formes précurseurs connues n'est pas suffisante pour valider le système solvant puisque nous cherchons à identifier de nouveaux précurseurs du 3SH. Il est également nécessaire dans un second temps de déterminer, non pas le coefficient de partage des formes précurseurs connues, mais celui du potentiel en 3SH.

Pour cela, 500 mL de moût préalablement filtré sur 0,45 μ m ont été extraits 15 minutes par un même volume de butanol. Les deux phases ont été évaporées et reprises séparément dans le milieu modèle de fermentation (MM 100g/L). Afin d'évaluer l'impact de l'extraction butanolique, une reconstitution a été menée en rassemblant les deux phases. Les fermentations sont réalisées en duplicat sur les 4 modalités suivantes :

- Témoin : moût avant extraction
- Phase A : Phase aqueuse (moût extrait au butanol)
- Phase B : Phase butanolique (extrait de moût)
- Phases A+B : Moût reconstitué (phase aqueuse + butanolique)

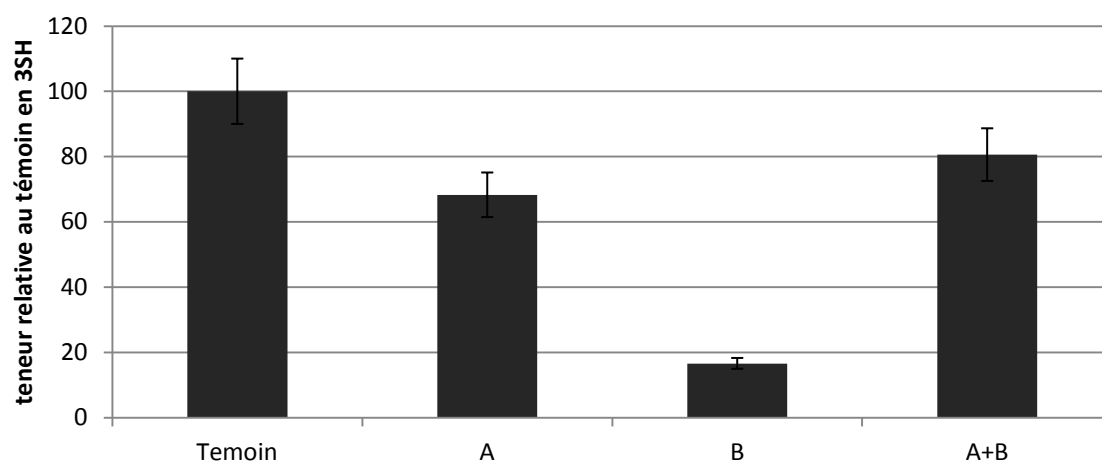


Figure 15 : Dosage du 3SH libéré « dans » chacune des phases obtenues après extraction. Phase A= libération de 3SH après fermentation alcoolique en milieu modèle de la phase aqueuse ; phase B= libération de 3SH après fermentation alcoolique en milieu modèle de la phase butanolique ; phase A+B= libération de 3SH après fermentation alcoolique en milieu modèle de la reconstitution des phases avant fermentation (n=2)

La libération de 3SH est majoritairement retrouvée dans la phase aqueuse (phase A) (Figure 15). La fraction extraite au butanol ne génère que 16 % du 3SH total. Cet essai nous permet également de confirmer que l'extraction butanolique n'influence que faiblement le potentiel en 3SH. En effet, la modalité de reconstitution du moût présente une libération d'arôme après fermentation proche du témoin avant extraction. Le coefficient de partage (phase A/phase B) peut être estimé à une valeur proche de 4.

3) Extraction du potentiel en 3SH par CPC

Comme la CPC correspond à une succession multiple d'extraction, il est envisageable d'extraire les composés précurseurs dans la phase butanolique en multipliant les cycles. Ainsi, il serait possible d'utiliser la CPC comme extracteur direct du moût afin de recueillir un extrait concentré en précurseur.

En théorie, la CPC engendre suffisamment de plateaux pour dissocier d'un côté la totalité des sucres et de l'autre la totalité des composés précurseurs en une seule étape contrairement à une simple extraction liquide-liquide en ampoule à décanter.

Afin d'évaluer quantitativement et qualitativement la capacité de la CPC en tant qu'extracteur liquide-liquide continu, le moût est utilisé comme la phase mobile et le butanol comme la phase stationnaire. Ce dernier devrait donc extraire successivement les composés précurseurs présents dans le moût.

L'extraction du moût par du butanol est réalisée en mode descendant où la phase stationnaire correspond au butanol saturé en eau et la phase mobile correspond au moût saturé en butanol. Pour cet essai nous avons utilisé la colonne de 100mL. Celle-ci est préalablement chargée de phase butanolique stationnaire, puis équilibrée avec le moût. L'élution est réalisée avec du butanol et l'extrusion avec de l'eau. Les conditions de la méthode sont détaillées dans le Tableau 12. Les fractions collectées sont ensuite regroupées, évaporées pour éliminer les solvants et fermentées en milieu modèle.

Tableau 12 : Conditions CPC lors de l'extraction de 125mL de moût sur la colonne de 100mL

Temps (min)	Vitesse de rotation (rpm)	Débit (mL/min)	Voie A (Phase aqueuse) (%)	Voie B (Moût) (%)	Voie C (Phase butanolique) (%)
Préparation de la colonne					
00 :00	500	30	0	0	100
10 :00	500	30	0	0	100
Equilibration					
00 :00	2000	12	0	100	0
37:30	2000	12	0	100	0
Elution					
37 :33	2000	12	100	0	0
47 :30	2000	12	100	0	0
Extrusion					
47 :33	2000	30	0	0	100
57 :30	2000	30	0	0	100

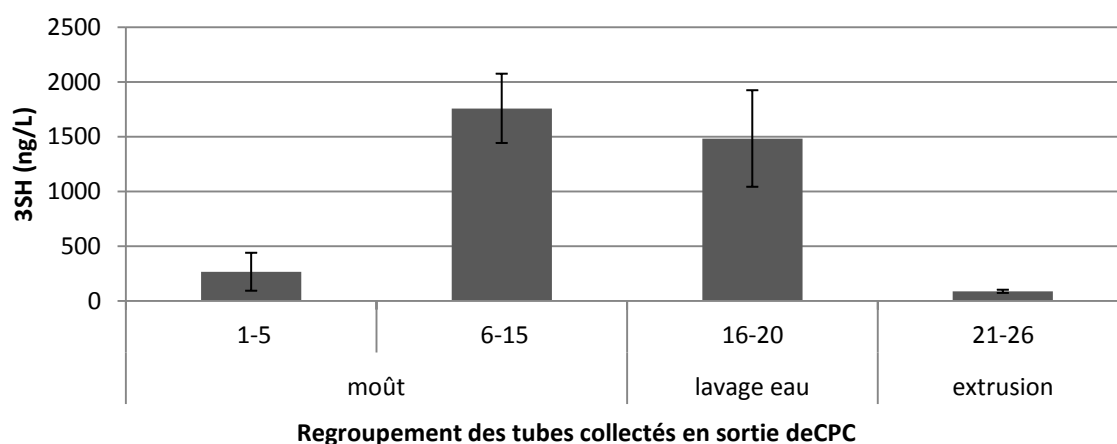


Figure 16 : 3SH libéré après fermentation des regroupements des fractions collectées après CPC. Les regroupements 1-5 et 6-15 correspondent à chacun un volume de moût élué. 16-20 correspond au lavage à l'eau. 21-23 correspond à l'extrusion butanolique (n=2)

La rétention de phase stationnaire à l'équilibre est proche de 50% et la pression maximum observée de 45 bars. Ces valeurs sont optimales pour le un bon déroulement de l'extraction.

Un regroupement des fractions collectées par CPC a été réalisé comme suit ; le regroupement des fractions 1-5 correspond au premier volume de moût élué (125mL ; 1 volume de colonne) dans la colonne alors que le regroupement 6-15 correspond aux deuxièmes et troisièmes volumes de colonne élués (250mL). Le butanol en phase stationnaire est lavé par 125 mL d'eau (un volume colonne ; regroupement 16-20) avant d'être récupéré lors de l'extrusion (regroupement 21-26).

Dans un premier temps, il est apparu que l'addition des différents regroupements de fraction CPC dans le milieu fermentaire n'a pas induit de différences significatives de la fermentation alcoolique (résultats non présentés). En effet, une contamination des extraits par des traces de solvants aurait pu gêner la fermentation et ainsi induire un biais dans la libération du 3SH.

L'analyse de la composante aromatique a été réalisée après fermentation alcoolique des différents regroupements des fractions collectées (Figure 16). Il apparaît que le premier volume de moût élué est épuisé en composés précurseurs du 3SH par extraction dans le butanol. En effet, la libération en 3SH est faible ce qui signifie que l'extrait de départ est pauvre en formes précurseurs. En revanche, une élution prolongée du moût (regroupement 6-15) semble saturer le butanol en formes précurseurs. En effet, ces derniers ne sont plus extraits du moût, et sont retrouvés dans cette phase aqueuse lors de l'élution. Il n'y a plus d'enrichissement en précurseurs dans la phase butanolique.

Le lavage de la phase stationnaire (butanol) par de l'eau (dépourvue en précurseurs) induit une ré-extraction de composés précurseurs d'arômes, ce qui induit un appauvrissement de la phase butanolique en précurseurs.

Dans cet essai, le K_D peut être ainsi estimé à une valeur légèrement inférieure à 1, puisque l'affinité entre les deux phases semble proche. Un K_D égal à 1 est idéal pour la purification d'un composé en matrice complexe par CPC mais ne l'est pas pour extraire ce composé avec un rendement élevé. Ce système de solvants ne semble donc pas approprié pour utiliser la CPC comme extracteur du moût.

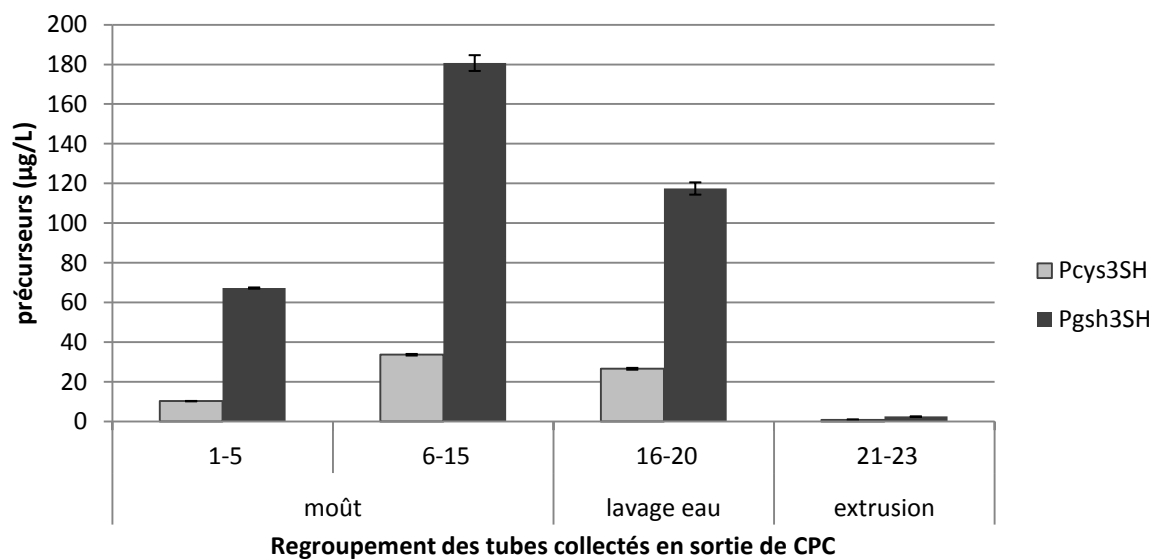


Figure 17 : Teneur en Pcys3SH et Pgsh3SH avant fermentation dans les regroupements de fraction CPC. Les regroupements 1-5 et 6-15 correspondent à chacun un volume de moût élué. 16-20 correspond au lavage à l'eau. 21-23 correspond à l'extrusion butanolique (n=2)

Les précurseurs S-conjugués à la cystéine ou au glutathion ont également été quantifiés avant fermentation dans le milieu modèle additionné des différents regroupements de fraction (Figure 17).

L'analyse avant fermentation des formes précurseurs, présente un profil de distribution entre les différentes fractions très similaire à celui observé pour les arômes dans les vins.

Ainsi l'extraction au butanol du moût par CPC en mode extracteur n'a pas permis d'obtenir un extrait renfermant le potentiel en 3SH du moût c'est-à-dire induisant une forte libération de 3SH après fermentation. Ceci est confirmé par le fait que l'extrait contienne également de faibles quantités de précurseurs du 3SH. Dans cet essai, la teneur en 3SH libéré dans les vins apparaît comme étant directement liée à la teneur en précurseurs cystéinylés et glutathionylés dans le milieu avant fermentation.

III. Tentative de fractionnement du potentiel en 3SH des moûts par CPC

Lors de ce second essai, nous avons cherché à fractionner le potentiel en 3SH à partir d'une injection directe de moût par CPC sur la colonne de 1L. Ne connaissant pas les propriétés des composés à purifier, un test de fractionnement/purification à l'aveugle est réalisé en utilisant un gradient de deux phases mobiles, ce qui permet ainsi de couvrir une large gamme de polarité. En effet pour chaque molécule il existe un coefficient de partage précis. Il est ainsi probable grâce au gradient d'obtenir la polarité adéquate à chaque composé au cours de l'analyse (Tableau 13).

Le fractionnement du moût par un gradient de solvants est réalisé en mode ascendant (la phase stationnaire correspond à l'eau saturée en solvants ; la phase mobile à un gradient allant d'un mélange acétate d'éthyle/butanol/eau à 100% de butanol). La colonne est préalablement chargée de phase aqueuse stationnaire, puis équilibrée avec la phase acétate d'éthyle/butanol/eau. Enfin, l'extrusion est réalisée par injection de la phase aqueuse. Les tubes sont regroupés, évaporés pour éliminer les solvants et soumis à une fermentation en milieu modèle.

Tableau 13 : Conditions CPC pour le fractionnement du potentiel en 3SH par injection directe du moût (volume de moût injecté = 150mL) et pourcentage des phases en cours d'analyse. A, B, C et D correspondent respectivement à l'eau saturée en butanol, le moût saturé en butanol, le mélange acétate d'éthyle-butanol-eau (60-30-10) et le butanol saturé en eau

Temps (min)	Vitesse de rotation (rpm)	Débit (mL/min)	Voie A (Phase aqueuse saturée en butanol) (%)	Voie B (Moût saturé en butanol) (%)	Voie C (Mélange acétate d'éthyle, butanol, eau) (%)	Voie D (butanol saturé en eau) (%)
Préparation de la colonne						
00 :00	500	80	100	0	0	0
15 :00	500	80	100	0	0	0
15 : 03	1200	30	0	0	100	0
34 : 00	1200	30	0	0	100	0
Injection de l'échantillon						
00 :00	1200	30	0	100	0	0
05 : 00	1200	30	0	100	0	0
Elution						
05 03	1200	30	0	0	100	0
20 : 00	1200	30	0	0	100	0
50 : 00	1200	30	0	0	0	100
65 : 00	1200	30	0	0	0	100
Extrusion						
65 : 03	1200	80	100	0	0	0
67 : 28	1200	80	100	0	0	0

La rétention à l'équilibre de la phase stationnaire est de 57% et la pression maximum est de 56 bars. Ces valeurs sont cohérentes pour un bon déroulement du fractionnement. Au total, 128 fractions de 23 mL ont été collectées.

Le regroupement des fractions a été réalisé comme suit ; les tubes 1 à 10 correspondent à l'injection du moût dans la colonne qui a induit une perte de la phase stationnaire initiale et sont composés théoriquement que de phase aqueuse. Le regroupement des fractions 11-23, 24-36 et 37-50 correspondent au gradient de polarité utilisé pour extraire les précurseurs de la phase stationnaire. Le gradient couvre une gamme allant de 100% d'acétate d'éthyle/ butanol / eau (30/60/10) à 100% de butanol. Les regroupements 51-58 et 59-69 correspondent à l'élution des composés de la phase stationnaire par du butanol. Enfin, le regroupement des fractions 70-128 correspond à la phase d'extrusion de la colonne par de la phase stationnaire (eau saturée en butanol).

Chaque regroupement est, soit concentré sous vide deux fois pour les fractions aqueuses, soit évaporé à sec pour celles constituées essentiellement de solvants.

Comme précédemment, nous avons vérifié que l'addition des fractions en milieu modèle n'induisait pas de modifications de la cinétique fermentaire (résultats non présentés).

L'analyse du 3SH libéré dans le milieu après fermentation est présentée dans la Figure 18. Il apparaît qu'aucune libération n'est observée après fermentation des fractions constituées des tubes 1 à 58 correspondant au gradient de polarité. Seule l'élution par du butanol semble extraire les composés précurseurs (59-69). L'extrusion de la colonne (70-128) permettant la récupération de la phase stationnaire, dans notre cas le moût, induit une forte libération de 3SH. Celle-ci est de l'ordre de 12 $\mu\text{g/L}$ alors que la fermentation du moût témoin est de l'ordre de 4 $\mu\text{g/L}$. A l'heure actuelle, cette augmentation importante des thiols n'est pas expliquée mais nous pouvons supposer que le gradient de solvant utilisé a pu extraire du moût des composés, soit inhibiteurs de la biotransformation des précurseurs par la levure, soit des "pièges" tels que des composés phénoliques capables de complexer les thiols volatils libérés.

Quoi qu'il en soit, le gradient de polarité ici utilisé n'a pas permis de fractionner le potentiel en 3SH des moûts. Ceci est confirmé par l'analyse des précurseurs S-conjugués à la cystéine ou au glutathion avant fermentation (Figure 19).

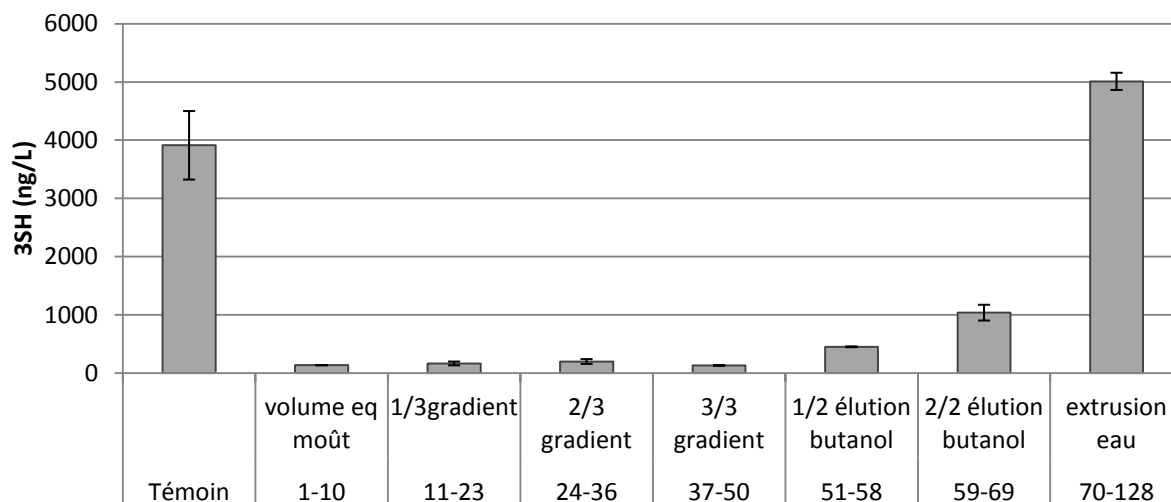


Figure 18 : Libération des arômes (3SH) après fermentation en milieu modèle des regroupements de fraction CPC. Le regroupement 1-20 correspond au volume de moût percolé. 11-23, 24-26 et 37-50 correspondent au gradient d'élution. 51-58 et 59-69 correspondent à l'élution au butanol. 70-128 correspond à l'extrusion (n=2)

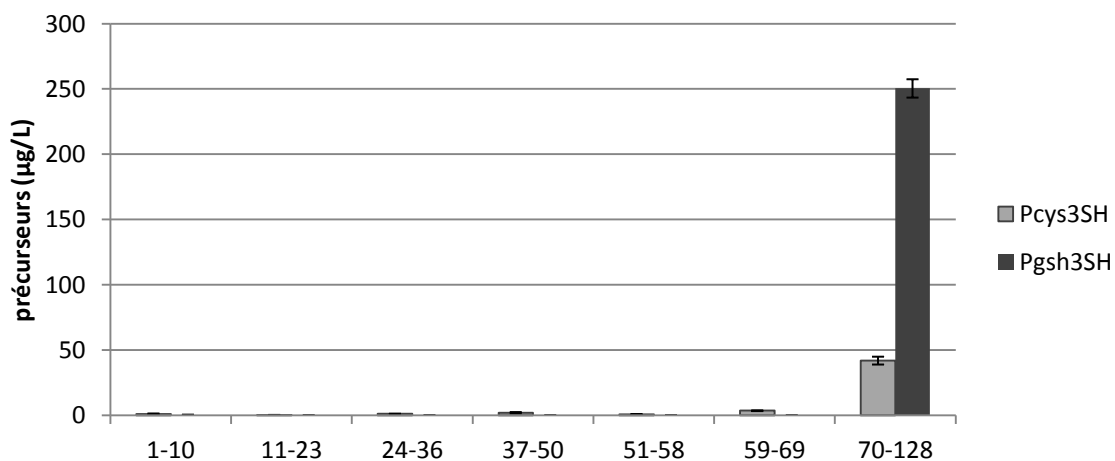


Figure 19 : Analyses des précurseurs connus du 3SH avant fermentation dans les regroupements de fraction CPC. Le regroupement 1-20 correspond au volume de moût percolé. 11-23, 24-26 et 37-50 correspondent au gradient d'élution. 51-58 et 59-69 correspondent à l'élution au butanol. 70-128 correspond à l'extrusion (n=2)

Cet essai nous permet donc de conclure, à nouveau, que ce système solvant n'est pas adapté à l'extraction des composés précurseurs d'arômes. En effet, dans l'idéal, les composés d'intérêt purifiés en CPC sont extraits par la phase mobile, or ici ce n'est pas le cas, ils sont récupérés en extrudant la colonne de sa phase stationnaire. La libération en 3SH et les précurseurs sont ainsi systématiquement retrouvés lors de l'extrusion de la colonne. Ce système de solvants ne semble donc pas assez polaire pour extraire ces composés qui restent préférentiellement dans la phase stationnaire aqueuse.

IV. Etude de l'impact de la matrice sur l'extraction du potentiel en 3SH

Nous avons d'abord voulu comprendre les raisons de l'échec des tests préliminaires (présentés Figure 13), qui à priori semblaient prometteurs. En effet, nous avons initialement observé qu'en système simplifié (butanol-eau), le coefficient de partage du Pcys3SH et du Pgsh3SH était respectivement de l'ordre de 0,8 et 3,7 (résultats non présentés). La première explication envisageable peut être l'influence éventuelle de la matrice (moût) sur le partage des précurseurs d'arômes entre les deux phases.

Le moût étant constitué en grande majorité de glucose et de fructose (environ 200g/L), il est possible que la teneur en sucre induise une modification de l'équilibre de répartition des composés entre la phase aqueuse (moût) et la phase organique (butanol). Afin de déterminer le partage des précurseurs connus dans un système donné, la méthode utilisée est celle de l'ampoule à décanter adaptée à des petits volumes. Le système de solvants est préparé à différentes concentrations en glucose et fructose de 0, 100, 200 à 400g/L et supplémenté en composés d'intérêt. Après agitation, le dosage du Pcys3SH et du Pgsh3SH est réalisé sur 1mL de chaque phase.

Tableau 14 : Impact de la teneur en sucres (glucose + fructose) de la phase aqueuse du système butanol-eau sur le partage du Pcys3SH et du Pgsh3SH. Avec $K_D = (C_{aqu.}) / (C_{org.})$

Teneur en sucre	K_D Pcys3SH	K_D Pgsh3SH
0	0,7	3,7
100	0,8	3,4
200	0,7	3,5
400	0,8	3,4

Le dosage des précurseurs dans chacune des phases obtenues, quelle que soit la concentration en sucres, indique que le Pcys3SH se partage entre les phases tandis que le Pgsh3SH est majoritairement présent dans la phase aqueuse (tableau 14). Ainsi, il apparaît que le sucre n'a pas d'effet sur l'affinité des composés pour les différentes phases du système, quelle que soit sa concentration (0 à 400g/L). La teneur en sucre n'est donc pas responsable de la différence observée entre les tests préliminaires d'extraction et l'extraction par CPC.

V. Développement d'un système de solvant adapté au fractionnement du potentiel en 3SH

La CPC, de par sa conception, est capable d'accepter tout système biphasique à partir du moment où les viscosités ne sont pas trop élevées, que le temps de séparation des deux phases après mélange n'est pas trop long et que les densités de chaque phase sont suffisamment différentes pour assurer leur séparation. Le nombre de systèmes de solvants envisageables est donc élevé.

Cependant, d'après les tests précédents, il apparaît que le butanol ne convient pas à l'extraction des composés précurseurs d'arômes présents dans les moûts, nos composés d'intérêt ayant une forte affinité pour la phase aqueuse. Il est donc nécessaire de déterminer de nouvelles conditions d'analyses afin d'obtenir une meilleure extraction des précurseurs par la phase organique. Toutefois, le système butanol-eau étant le plus polaire des systèmes biphasiques simples, deux alternatives ont été étudiées ; l'une repose sur le principe de démixtion de solvants miscibles dans l'eau tandis que l'autre s'appuie sur les propriétés de miscibilité de solvants polaires entre deux phases non miscibles, on parlera alors de solvant "pont". **Etude de systèmes solvants obtenus par démixtion**

La démixtion est un phénomène par lequel deux composés miscibles (généralement liquides) sont séparés en deux phases distinctes par modification de leur solubilité

Tableau 15 : Nombre de phases observées et stabilité du système solvant lors la démixtion du solvant et de l'eau par le sulfate d'ammonium

	Nombre de phase	Stabilité du système
Ethanol	2	Précipitation
Méthanol	1	Précipitation
Acétonitrile	2	Stable
Isopropanol	2	Stable

respective. L'exemple le plus courant est la démixtion de l'éthanol d'une solution aqueuse par saturation de celle-ci en sel.

Ainsi, la démixtion permet d'obtenir différents systèmes solvants biphasique de polarité élevée. De plus, la saturation de la phase aqueuse par des sels induit une modification de la solubilité des composés dans celle-ci qui auront ainsi une plus grande affinité pour la phase organique.

Dans cette partie, nous avons dans un premier temps cherché à développer de nouveaux systèmes solvant à polarité élevée, puis nous avons étudié de leur compatibilité en CPC et enfin la pertinence de l'utilisation de ces systèmes dans notre application a été déterminée par l'étude du coefficient de partage des composés d'intérêt.

1.1) Impact de la nature du sel utilisé

La démixtion de différents solvants à caractère polaire et miscible dans l'eau tels que l'éthanol, le méthanol, l'acétonitrile ou l'isopropanol a été étudiée par saturation de la phase aqueuse par du sulfate d'ammonium. Ce dernier est ajouté à sa concentration limite de saturation dans l'eau qui est de 750g/L.

Seul le méthanol n'a pu être extrait de la phase aqueuse par l'addition de sulfate d'ammonium sulfate (Tableau 15). De plus, celui-ci peut également entraîner une précipitation des sels, ce qui rend alors le système incompatible à l'utilisation de la CPC. L'acétonitrile et l'isopropanol sont de bons candidats pour la suite du projet.

Par ailleurs, l'impact d'une addition de sulfate d'ammonium dans le système butanol-eau précédemment utilisé a été évalué. Dans ce cas, le sel n'est pas utilisé comme agent de démixtion mais afin de déplacer l'affinité des composés polaires vers la phase organique. Il apparaît que quel que soit le sel considéré, le système reste biphasique et limpide (résultats non présentés).

Tableau 16 : Coefficients de partage calculés des précurseurs cystéinylés et glutathionylés pour chaque système de solvant testé. Il correspond au ratio de la concentration de la phase aqueuse sur celle de la phase organique. Un K_D supérieur à 100 indique que plus de 99% des composés sont contenus dans la phase aqueuse (n=2)

	K_D Pcys3SH	K_D Pgsh3SH
Acétonitrile-eau sat.	>100	>100
Isopropanol-eau sat.	$0,2 \pm 0,05$	$0,2 \pm 0,06$
Butanol-eau	$0,7 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,6$
Butanol-eau sat.	$0,7 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,8$

1.2) Détermination du coefficient de partage des précurseurs en fonction du système utilisé

Le système solvant est préparé en petit volume (5mL de solvant et 5mL d'eau saturée en sel) et supplémenté en Pcys3SH et Pgsh3SH (250µg/L). Après agitation, 1mL de chaque phase est prélevé, séché, redissout dans 1mL d'eau et purifié sur C₁₈ par la méthode classique d'analyse des moûts afin d'éliminer les sels présents. Le coefficient de partage correspond au rapport des concentrations entre la phase aqueuse et la phase organique.

Le but est de sélectionner un système solvant pour lequel le partage des formes précurseurs est le plus proche possible de 50% (soit un K_D de 1). En effet, la purification d'un composé par CPC avec un système solvant donné est optimale lorsque son K_D est proche de 1.

Le dosage des précurseurs dans les deux phases (aqueuse et organique) indique que le K_D obtenu par le système acétonitrile-eau saturée est supérieur à 100 (tableau 16). Les précurseurs cystéinylés et glutathionylés sont donc présents majoritairement dans la phase aqueuse. L'acétonitrile n'a pas extrait les précurseurs malgré la présence de sels. Ce système n'est donc pas sélectionné.

Concernant l'isopropanol, il apparaît que les K_D sont de 0,2 pour les deux formes précurseurs. Ils sont donc majoritairement retrouvés dans la phase organique.

L'addition de sel dans le système butanol-eau ne modifie que peu la distribution des précurseurs dans les phases.

1.3) Etude de l'influence de la concentration en sels

Les tests réalisés avec des sels ont montré que le système de solvant isopropanol/eau saturée en sel permettait d'extraire les formes précurseurs connues. En effet, la concentration en précurseurs dans la phase isopropanolique est supérieure à celle de la phase aqueuse. Néanmoins, le K_D souhaité est de 1 (concentrations en précurseurs égales dans les deux phases). L'extraction par l'isopropanol est donc trop importante à ces concentrations en sels (saturation égale à 100%) et indique que tous les précurseurs seraient élués en même temps, au début du fractionnement en CPC en mode ascendant.

Tableau 17 : Calcul des coefficients de partage des précurseurs cystéinylés et glutathionylés dans le système isopropanol-eau, selon la saturation en sels

Saturation	K _D Pcys3SH	K _D Pgsh3SH
100%	0,22 ± 0,01	0,21 ± 0,01
75%	0,23 ± 0,01	0,26 ± 0,02
50%	0,32 ± 0,02	0,33 ± 0,02

Tableau 18 : Calcul des coefficients de partage des précurseurs cystéinylés et glutathionylés pour chaque système de solvant testé, selon la composition de la phase organique (isopropanol ou acétonitrile) (n=2)

Solvants		K _D Pcys3SH	K _D Pgsh3SH
Isopropanol	Acétonitrile		
100%	0	0,1 ± 0,04	0,1 ± 0,01
80%	20%	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01
60%	40%	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,06
40%	60%	0,3 ± 0,02	0,5 ± 0,01

Une saturation plus faible pourrait diminuer l'extraction des précurseurs par la phase organique et donc se rapprocher d'un K_D de 1.

Le même protocole est mis en place et 3 modalités sont testées : 100% de saturation en sel, 75% et 50% (tableau 17). Les K_D calculés pour chaque système de solvants sont systématiquement inférieurs à 1, ce qui indique que la concentration en précurseurs est supérieure dans la phase organique. De plus, la modification de la saturation en sels semble peu influencer cette répartition. En effet, le K_D des deux types de précurseurs est proche de 0,2 pour une saturation en sels de 100%, et de 0,3 pour 50% de saturation. Comme il n'est pas possible de tester une saturation en sels inférieure (le phénomène de démixtion n'apparaît plus), alors la répartition égale des deux formes précurseurs entre les deux phases n'est pas réalisable.

1.4) Optimisation de la composition de la phase organique

Les tests précédents ont montré que dans un système saturé en sulfate d'ammonium, l'isopropanol extrayait beaucoup les précurseurs alors que l'acétonitrile, en présence des mêmes types de sels, n'extrayait rien. En nuanciant la composition de la phase organique, il est alors envisageable d'obtenir un K_D proche de 1.

Ainsi, dans les tests réalisés, la composition de la phase organique varie de 100% d'isopropanol (forte capacité d'extraction) à 40% d'isopropanol et 60% d'acétonitrile (faible capacité d'extraction). Pour les deux formes précurseurs, il apparaît que les K_D varient avec la composition de la phase organique (Tableau 18). En effet, plus celle-ci est riche en acétonitrile, plus le K_D se rapproche de 1, et moins la phase organique est riche en précurseurs. La diminution de la concentration en isopropanol (et augmentation d'acétonitrile), permet de diminuer la concentration en précurseurs dans la phase organique. Ainsi il est envisageable d'obtenir un K_D de 1 pour chaque composé en travaillant avec gradient de ces deux solvants lors de l'élution en CPC. En effet, comme le pourcentage d'acétonitrile nécessaire à l'obtention d'un K_D de 1 est différent selon le composé considéré, l'utilisation d'un gradient devrait permettre d'atteindre obligatoirement à un moment donné le pourcentage optimal à chaque forme.

2) Conclusions

Ces systèmes ici développés semblent donc être compatibles à un fractionnement du potentiel en 3SH des moûts par CPC. Seulement, pour déterminer si les fractions obtenues libèrent du 3SH, elles doivent nécessairement être fermentées, or la concentration élevée des sels dans les fractions d'élution les rend non fermentescibles. L'élimination des sels par dialyse n'a pas donné de résultats concluants car nécessiterait plusieurs dialyses pour éliminer la totalité des sels présents. L'utilisation de colonne de dessalage a également été envisagée mais chaque étape supplémentaire induit automatiquement une baisse dans le rendement de purification. L'utilisation de sels lyophilisables tels que le formiate d'ammonium ou l'acétate d'ammonium a également été testée, mais ceux-ci n'induisent pas systématiquement de démixtion et ne modifient que peu le K_D du système initial.

VI. Etude de la performance des solvants pontés dans la séparation des S-conjugués

Dans cette partie, une autre approche a été tentée. Il s'agit de système solvant dit « ponté », c'est-à-dire qu'à deux solvants non miscibles A et B est ajouté un troisième solvant C de polarité désirée miscible dans A et B. Le solvant C se comporte comme un pont entraînant les composés de la phase A à la phase B même si leur affinité pour B est faible (Grace *et al.*, 2014).

1) Nature des systèmes de solvants

Comme les composés du potentiel en 3SH présentent un caractère polaire, nous avons testé l'aptitude de solvants de forte polarité tels que l'éthanol, le méthanol, l'isopropanol, l'acétonitrile ou encore le chloroforme comme « pont » entre l'eau et le butanol. L'isopropanol a également été testé dans un système acétate d'éthyle-eau. Il a été démontré que ce dernier pouvait donner d'excellents résultats pour la purification et la séparation de composés polaires en matrice chargée tels que les geniposide de gardénia ou encore les mangiférines de rhizomes (Young Kim *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2007).

Tableau 19 : Répartition du volume des phases en fonction des combinaisons de solvant testées et temps de séparation des phases après agitation. Les cases grisées correspondent à des combinaisons de solvants sélectionnés pour la suite de l'étude

Système	Proportions	Volume de phases	Temps de séparation
Butanol/Ethanol/Eau <i>(Solomko et al.,)</i> <i>(1962)</i>	6/1/12	25% butanol / 75% eau	40 secondes
	6/2/10	30% butanol / 70% eau	40 secondes
	6/3/10	Une seule phase	
	10/3/12	60% butanol / 40% eau	25 secondes
	10/2/12	50% butanol / 50% eau	25 secondes
	10/1/12	40% butanol / 60% eau	25 secondes
	10/4/12	Une seule phase	
Butanol/Isopropanol/Eau <i>(Morozov et al.,)</i> <i>(1979)</i>	7/1/8	50% butanol / 50% eau	15 secondes
	7/1.5/8	50% butanol / 50% eau	15 secondes
	7/2/7	60% butanol / 40% eau	30 secondes
	7/2/8	60% butanol / 40% eau	20 secondes
Butanol/Méthanol/Eau <i>(Grace et al.,)</i> <i>(2014)</i>	5/1/5	50% butanol / 50% eau	40 secondes
	5/2/5	Une seule phase	
	5/3/5	Une seule phase	
	10/1/10	50% butanol / 50% eau	20 secondes
	10/2/10	60% butanol / 40% eau	25 secondes
	10/3/10	émulsion	> 1min
Acétate d'éthyle/Isopropanol/Eau <i>(Köhler et al.,)</i> <i>(2008)</i>	20/1/20	50% butanol / 50% eau	15 secondes
	20/5/20	50% butanol / 50% eau	15 secondes
	20/10/20	60% butanol / 40% eau	20 secondes
Butanol/Acétonitrile/Eau	5/0,5/5	50% butanol / 50% eau	25 secondes
	5/1,5/5	60% butanol / 40% eau	30 secondes
Butanol/Chloroforme/Eau	5/0,5/5	60% butanol / 40% eau	25 secondes
	5/1,5/5	60% butanol / 40% eau	25 secondes

(le système butanol/eau bien connu avec le méthanol comme pont a été adapté avec d'autres solvants ponts, tels que l'acétonitrile et le chloroforme)

Dans un premier temps, nous avons testé la stabilité de différentes combinaisons de solvants. Nous avons également déterminé le pourcentage de chaque phase (phase inférieure et supérieure) et le temps de séparation entre les deux phases après agitation. Celui-ci doit être court (<30 secondes) pour que le système soit compatible en CPC. Le pourcentage de chaque solvant est adapté selon la polarité des composés à isoler (Ito, 2005).

Les essais réalisés indiquent que toutes les combinaisons de solvants ne sont pas aptes à former deux phases non miscibles et équitables. Seules celles permettant une répartition proche de 50/50 sont sélectionnées (Tableau 19, lignes grises). En effet, le nombre de possibilités est immense et la sélection d'un système de solvants adapté au fractionnement du potentiel en 3SH engendre automatiquement des étapes longues et fastidieuses telle que la fermentation alcoolique. Ainsi, il est préférable de réduire ces essais aux meilleures combinaisons de solvants.

2) Détermination du coefficient de partage des précurseurs en condition modèle

Comme précédemment, le but est de sélectionner un système de solvants pour lequel le partage des formes précurseurs est le plus proche possible de 50/50. Pour cela, le K_D des précurseurs a été déterminé comme précédemment sur petit volume de solvant additionné des composés purs (250µg/L).

Tableau 20 : Calcul des coefficients de partage des précurseurs cystéinylés et glutathionylés pour chaque système et chaque proportion de solvants testés. Avec $K_D = (Caqu.) / (C\ org.)$ Les cases grisées correspondent à des résultats satisfaisants

Solvants	Proportion	K_D Pcys3SH	K_D Pgsh3SH
Butanol/Ethanol/Eau	10/3/12	0,9	8,1
	10/2/12	0,7	16,4
	10/1/12	1,2	>100
Butanol/Isopropanol/Eau	7/1/8	0,7	31,9
	7/1,5/8	1,1	26,8
	7/2/8	0,7	13,8
Butanol/Méthanol/Eau	10/1/10	0,7	24,1
	10/2/10	0,7	11,1
Acétate d'éthyle/Isopropanol/Eau	20/1/20	>100	>100
	20/5/20	>100	>100
	20/10/20	7,1	>100
Butanol/Acétonitrile/Eau	5/0,5/5	0,7	64,1
	5/1,5/5	0,9	7,7
Butanol/Chloroforme/Eau	5/0,5/5	>100	>100
	5/1/5	>100	>100

Il est admis que la purification d'un composé par CPC est optimale lorsque ce composé présente un K_D compris entre 0,5 et 1,5. Le dosage des précurseurs, présenté dans le Tableau 20, indique que de nombreuses combinaisons permettent d'obtenir une concentration dans la phase organique proche de la concentration dans la phase aqueuse (K_D proche de 1) pour le Pcys3SH. En revanche, aucun système ne semble convenir à la purification du Pgsh3SH puisque les K_D observés sont tous supérieurs à 7.

Le fractionnement par CPC vise à purifier des précurseurs d'arômes potentiels, de formule brute et structure inconnue. Cependant, nous avons vu précédemment que ces composés semblaient présenter une polarité similaire voir supérieure à celle des formes connues. De plus, la démarche mise en place s'appuie sur l'hypothèse d'une structure moléculaire proche de celle de précurseurs connus. Ainsi, le choix du système de solvants est basé sur les formes cystéinylées et glutathionylées. Il apparaît d'après nos tests que plusieurs systèmes sont adéquats pour les précurseurs cystéinylés, mais pas pour les glutathionylés. L'utilisation de système ponté a donc permis de gagner en degré de polarité mais il reste essentiel de trouver un système qui soit validé pour les deux formes précurseurs.

3) Impact du pH sur le coefficient de partage des précurseurs

Comme les précurseurs sont des dérivés d'acides aminés, et que la solubilité de ces derniers est dépendante du pH alors il est possible d'envisager que leur solubilité et donc leur K_D peut être influencé par le pH du système solvant. En effet, les acides aminés sont généralement que peu solubles à un pH autour de leur pH_i et leur solubilité dans les solvants plus apolaires dépend de leur chaîne latérale. Nous avons donc fait varier le pH de nos systèmes afin de modifier leur comportement vis-à-vis des solvants.

Nous avons sélectionné le système permettant la meilleure extraction des précurseurs glutathionylés par la phase organique pour tester l'impact du pH de la phase aqueuse. Ce système est composé de butanol, acétonitrile et eau, en proportions 5/1,5/5.

Tableau 21 : Calcul des coefficients de partage (K_D) des précurseurs cystéinylés et glutathionylés pour le système butanol, acétonitrile et eau, en proportions 5/1,5/5, selon le pH. Avec $K_D = (C_{aq.}) / (C_{org.})$

Solvant	pH	K_D Pcys3SH	K_D Pgsh3SH
Butanol/Acétonitrile/Eau	1,5	0,7	1,5
	3	2,1	1,5
	5	2,1	6,25
	7	1,1	5,1

D'après ces résultats, il est possible d'observer que la distribution des précurseurs cystéinylés entre les deux phases varie fortement avec le pH initial de la phase aqueuse (Tableau 21). En effet, à pH=1,5 la concentration en Pcys3SH est plus importante dans la phase organique que dans la phase aqueuse (K_D inférieur à 1). A l'inverse, pour des pH de 3, 5 ou 7, les Pcys3SH sont majoritaires dans la phase aqueuse (K_D supérieur à 1). Toutefois, les coefficients de partage restent proches de 1, et comme l'indiquaient les résultats précédents, ce système semble adapté pour les précurseurs cystéinylés, quel que soit le pH.

Concernant le dosage des précurseurs glutathionylés, il s'avère qu'il existe de fortes variations de distribution selon le pH. En effet, à pH=5 et pH=7, la phase organique contient très peu de précurseurs (K_D supérieur à 1), alors qu'à pH acide (pH1,5 et pH3), la concentration en Pgsh3SH est presque égale entre les deux phases. Il apparaît donc, que grâce à la modification du pH, il soit possible d'extraire les précurseurs glutathionylés de la phase aqueuse.

Ainsi, un pH acide semble faciliter l'extraction des composés précurseurs. Le système Butanol/Acétonitrile/Eau, à pH 1,5 (BAE1,5) est donc sélectionné pour la suite.

4) Adéquation des systèmes à la purification du potentiel en 3SH

Un fractionnement par CPC nécessite premièrement de sélectionner un système de solvant adapté aux composés d'intérêt et le système Butanol/acétonitrile/eau (5/1,5/5), à pH acide, semble convenir. En effet, le partage des formes précurseurs connues est proche de 1, ce qui signifie une séparation optimale.

Dans notre cas, le développement du système de solvants se base sur la répartition des précurseurs cystéinylés et glutathionylés dans les deux phases du système, car les composés d'intérêt sont inconnus. La seule information qu'il est possible d'obtenir sur les composés potentiellement précurseurs d'arômes concerne leur libération de 3SH. En effet, une libération du 3SH équitable entre les deux fractions indiquera que les précurseurs initialement présents sont également équitablement répartis.

Afin de vérifier la pertinence de ce système de solvants BAE1,5, sur les formes potentiellement précurseurs d'arômes, nous avons testé ce système sur l'extrait obtenu

Tableau 22 : Calcul des coefficients de partage (K_D) des précurseurs cystéinylés, glutathionylés et du 3SH libéré après fermentation de ces fractions. La fraction Elu1% ne contient pas de formes précurseurs connues au départ et Elu 30% renferme l'ensemble des précurseurs connus. Avec K_D = rapport des concentrations de la phase aqueuse sur celle de la phase organique. Avec $K_D=(Caqu.)/(C_{org.})$

Fractions SPE	K_D Pcys3SH	K_D Pgsh3SH	K_D 3SH
Elu 1%	-	-	0,7
Elu 30%	0,7	1,5	0,5

précédemment par SPE. En effet, bien qu'instable, ce fractionnement du moût par SPE avait permis d'obtenir deux fractions libérant du 3SH après fermentation : une fraction d'élution à 1% de méthanol (Elu 1%), qui ne contient pas de précurseurs connus, et une fraction d'élution à 30% de méthanol (Elu 30%), qui contient des précurseurs cystéinylés et glutathionylés.

Une extraction indépendante de ces deux fractions a été réalisée avec le système de solvants sélectionné (système BAE1,5). Les différentes phases ont été évaporées, lyophilisées, et additionnées à du milieu modèle de fermentation. Un dosage du 3SH, après fermentation alcoolique, est réalisé. Le calcul du K_D basé sur la libération de 3SH après fermentation, permet de déterminer si le système de solvants développé est adapté (Tableau 22). Les K_D du Pcys3SH et du Pgsh3SH obtenus confirment que ce système de solvants reste adapté au fractionnement des précurseurs connus d'un extrait de SPE, en effet, ils sont proches de 1 (0,7 pour les précurseurs cystéinylés et 1,5 pour les précurseurs glutathionylés). Concernant la distribution du 3SH après fermentation, il apparaît que les deux phases (aqueuse et organique) conduisent à une libération similaire (K_D de l'ordre de 0,7 pour la fraction Elu1% et de 0,5 pour Elu30%, tableau 12). Il est donc possible de déduire le coefficient de partage du potentiel en 3SH de chaque fraction obtenue par percolation du moût sur C_{18} .

Ainsi, il semblerait que ce système adapté aux deux formes connues le soit aussi pour les formes inconnues.

4.1) Compatibilité du système Butanol/Acétonitrile/Eau (BAE1,5)

La compatibilité du système développé a été testée en condition réelle d'utilisation c'est-à-dire en CPC. Nous avons très vite été confrontés à un nouveau problème. Il s'est avéré que ce système présentait un volume de rétention de la phase stationnaire dans la colonne inférieure à 15 %. Nous avons cherché à optimiser la rétention du système en jouant sur la vitesse de rotation de la colonne et le débit lors de l'étape d'équilibration des phases mais la rétention n'a pas pu être améliorée. Ainsi, malgré les propriétés intéressantes de ce système BAE pour le fractionnement de potentiel en 3SH, il doit être abandonné puisque non applicable.

Tableau 23 : Coefficients de partage (K_D) des précurseurs cystéinylés et glutathionylés pour chaque système de solvant testé. Avec $K_D = (C_{aqu.}) / (C_{org.})$

Solvants	pH	K_D Pcys3SH	K_D Pgsh3SH
Butanol/Méthanol/Eau (10/2/10)	1,5	1,5	1,5
Butanol/Méthanol/Eau (36,4/10,6/53)	1,5	0,9	1,4
	2,5	0,9	1,3
	3,5	1,1	1,6

4.2) Compatibilité du système Butanol/Méthanol/Eau (BME)

Nous avons vu précédemment que différents systèmes testés étaient compatibles à la purification des précurseurs cystéinylés. De plus, nous avons mis en évidence que le pH avait un impact important sur la répartition des précurseurs glutathionylés dans les deux phases du système. Sur cette base, nous avons cherché à développer un nouveau système. Il apparaît que le système butanol/méthanol/eau (BME) présente des caractéristiques proche du système BAE. De plus ce système a déjà été publié à plusieurs reprises et garantit donc sa compatibilité avec la CPC (Grace *et al.*, 2014).

Comme pour le système BAE, le pH a été ajusté afin d'optimiser l'extraction des précurseurs.

Le calcul des coefficients de partage des précurseurs cystéinylés indique que le système Butanol/méthanol/eau en proportions 36,4/10,6/53 est idéal, quel que soit le pH de la phase aqueuse (Tableau 23). En effet, le K_D est presque de 1. Par ailleurs, le coefficient de partage des précurseurs glutathionylés se rapproche de 1 pour des proportions en Butanol/méthanol/eau de 36,4/10,6/53, à pH=2,5 ($K_D=1,31$). Ce système semble donc être adapté aux formes cystéinylées et glutathionylées, ce qui suggère qu'il le soit pour les formes inconnues. Il apparaît que le système BME2,5 permet d'obtenir une répartition idéale des formes précurseurs entre les deux phases.

Le système de solvants a également été testé en conditions réelles de CPC. La rétention de la phase stationnaire est d'environ 60% ce qui valide ce système.

VII. Utilisation de la CPC pour le fractionnement d'un extrait de moût obtenu par SPE-C₁₈

Maintenant que le système solvant BME2,5 pour le fractionnement du potentiel en 3SH a été validé en terme de partage des composés entre les phases et de rétention dans la colonne, il est possible d'appliquer cette méthode au fractionnement des moûts en vue de leur caractérisation. Ainsi dans cette partie, nous avons tenté de refractionner par CPC avec le système BME2,5 un extrait brut obtenu par SPE-C₁₈ correspondant à 400mL de moût.

Tableau 24 : Condition CPC pour le fractionnement d'un extrait de moût, équivalent à 400mL, avec le système butanol/ méthanol / eau, à pH=2,2 (BME2,5)

Temps (min)	Débit (mL/min)	Mode	Vitesse de rotation (rpm)	Eau Voie A (%)	Butanol Voie B (%)
Préparation de la colonne					
00 :00	10	Descendant	500	0	100
40 :00	10	Descendant	500	0	100
Equilibration					
00 :00	5	Descendant	2000	100	0
15 :00	5	Descendant	2000	100	0
Injection de l'échantillon et élution					
00 :00	5	Descendant	2000	100	0
120 :00	5	Descendant	2000	100	0
Extrusion					
120 :00	5	Descendant	2000	0	100
160 :00	5	Descendant	2000	0	100

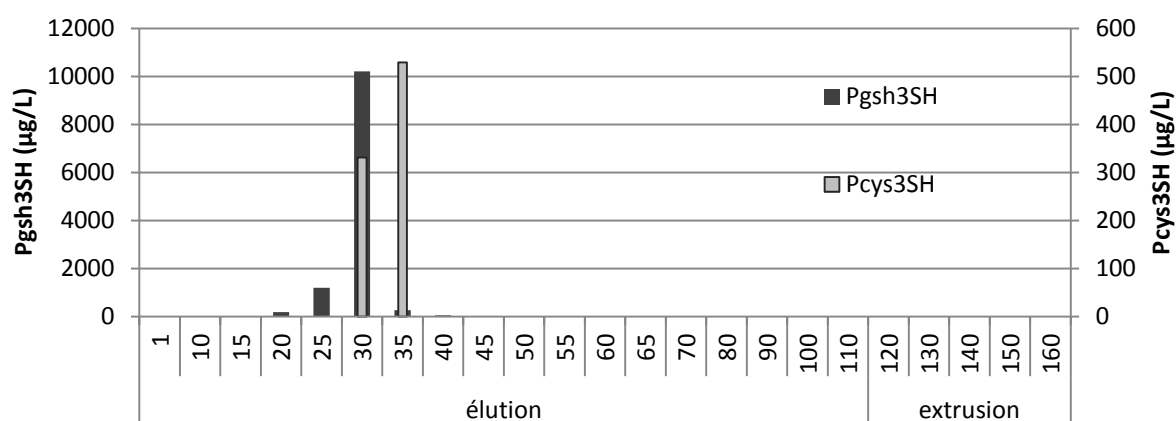


Figure 20 : Dosage des précurseurs cystéinylés et glutathionylés (µg/L) dans les tubes récupérés en sortie de CPC. Les tubes 1 à 110 correspondent à la phase d'élution aqueuse, récupérée en sortie de CPC. Les tubes 120 à 160 correspondent à la phase d'extrusion butanolique récupérée en sortie de CPC

1) Fractionnement du potentiel en 3SH

Le fractionnement est réalisé en mode descendant sur la colonne de 100mL (la phase stationnaire correspond au butanol saturé en eau et méthanol ; la phase mobile correspond à la phase aqueuse saturée en butanol et méthanol). La méthode CPC est détaillée dans le Tableau 24. L'extrait injecté correspond à un volume initial de 400mL de moût. Le débit d'injection des phases dans la colonne a été abaissé à 5mL/min afin de garantir un volume de rétention de la phase stationnaire optimal et d'éviter une perte de phase au cours de l'élution (« bleeding ») (Tableau 24). Nous avons observé un volume de rétention de 65mL correspondant à 59% et une pression à l'équilibre (Peq) de 30 bars.

L'analyse du Pcys3SH et du Pgsh3SH, réalisée tous les cinq tubes (5mL) sur 500 µL permet un regroupement des fractions en fonction de leur contenu (Figure 20).

Le dosage des précurseurs cystéinylés et glutathionylés dans chacun des tubes récupérés en sortie de CPC indique que ce système semble adapté à la purification de ces composés. En effet, pour un fractionnement optimal, les composés doivent être élués lors de la phase d'élution et non dans la phase d'extrusion. On considère que le volume d'élution d'un composé est optimal en termes de pureté quand celui-ci est compris entre 0,5 et deux volumes de colonne.

Il apparait que les précurseurs glutathionylés sont élués légèrement plus tôt que les cystéinylés (respectivement à un V_{eq} de 1,5 pour les Pcys3SH et un V_{eq} de 2,3 pour les Pgsh3SH). Ce système est donc validé en conditions de CPC pour purifier les formes précurseurs connues.

Le regroupement des tubes de CPC est réalisé de la sorte ; les tubes 15-40 contiennent les formes précurseurs connues, ils sont donc regroupés ; les tubes précédents sont regroupés entre eux (1-14) ; les tubes 40-120 sont séparés arbitrairement en trois (41-66, 67-93, 94-120) ; enfin la phase d'extrusion est regroupée en une seule fraction (121-160).

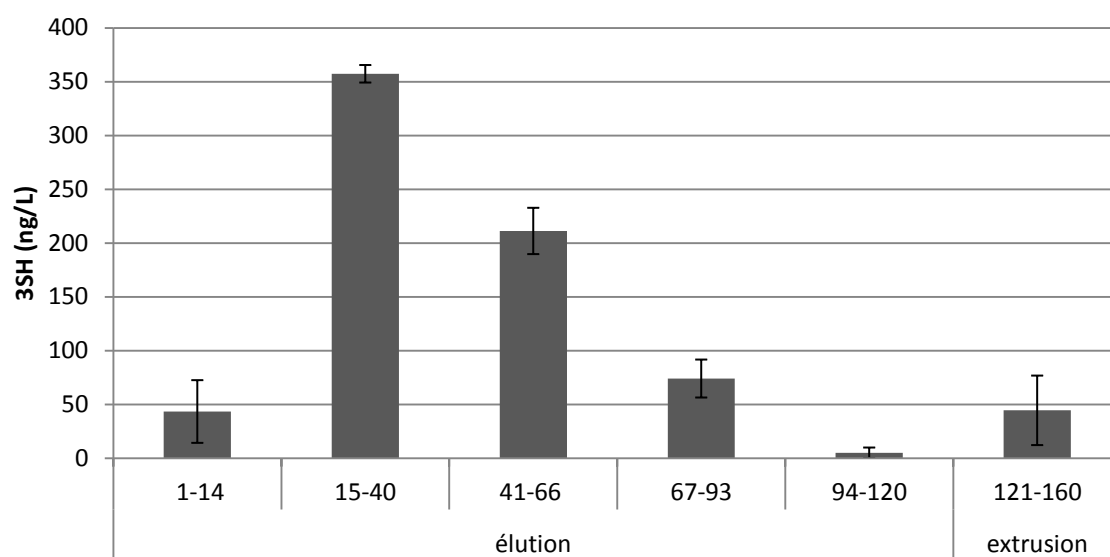


Figure 21 : Dosage du 3SH libéré après fermentation en milieu modèle des regroupements des fractions obtenues par CPC. Les regroupements 1-14, 15-50, 41-66, 67-93 et 94-120 correspondent à la phase d'élution aqueuse. Le regroupement 121-160 correspond à la phase d'extrusion butanolique (n=2)

Chaque regroupement (correspondant à 400mL de moût) est ensuite évaporé à sec dans sa totalité, lyophilisé et enfin additionné en milieu modèle de fermentation (2 x 75 mL).

D'après la Figure 21, il apparaît que quelle que soit la fraction considérée, la libération du 3SH après fermentation est inférieure à 350 ng/L tandis que la somme du 3SH libéré après CPC est de l'ordre de 720 ng/L. Sachant que la fermentation de l'extrait initial produit 1600ng/L de 3SH (résultats non présentés), le rendement de ce fractionnement n'est alors que de 45%.

Par ailleurs, une libération de 3SH est observée « dans » le regroupement 15-40. Celui-ci contient les formes connues Pcys3SH et Pgsh3SH.

En revanche, le regroupement 41-66 qui ne contient pas de précurseurs connus, conduit à une forte libération de 3SH. Il est donc possible que ce regroupement renferme des CPPA. Ainsi, il semble que le système de solvant butanol/méthanol/eau à pH2,5 basé sur les formes précurseurs connues soit également adapté au fractionnement de ces composés potentiellement précurseurs d'arômes.

Enfin, les regroupements 1-14, 67-93 et 121-160 ne libèrent qu'une très faible de quantité de 3SH. Les fractions ainsi collectées ne semblent donc pas contenir de composés directement précurseur d'arôme.

En conclusions, ce fractionnement en CPC100 a permis de mettre en évidence de nouveaux composés potentiellement précurseurs d'arôme (CPPA) dans le regroupement 41-66, à partir d'un extrait correspondant à 400mL de moût. La contribution de ces CPPA est non négligeable puisqu'elle est correspond à 30% du 3SH total après CPC. Cependant, le rendement de ce fractionnement est faible pour cette technique qui, théoriquement, ne conduit pas à la perte de composés. Il est alors envisageable que la biotransformation des formes précurseurs soit affectée par les traces potentielles de butanol, d'où une libération en 3SH plus faible que celle attendue. Un dosage des précurseurs dans les regroupements, avant fermentation, aurait alors indiqué si le rendement de récupération était en accord avec cette technique. Des concentrations en précurseurs élevées auraient alors signifié que la faible libération de 3SH était due à une faible biotransformation des précurseurs. Ainsi, il apparaît essentiel de confirmer ces résultats.

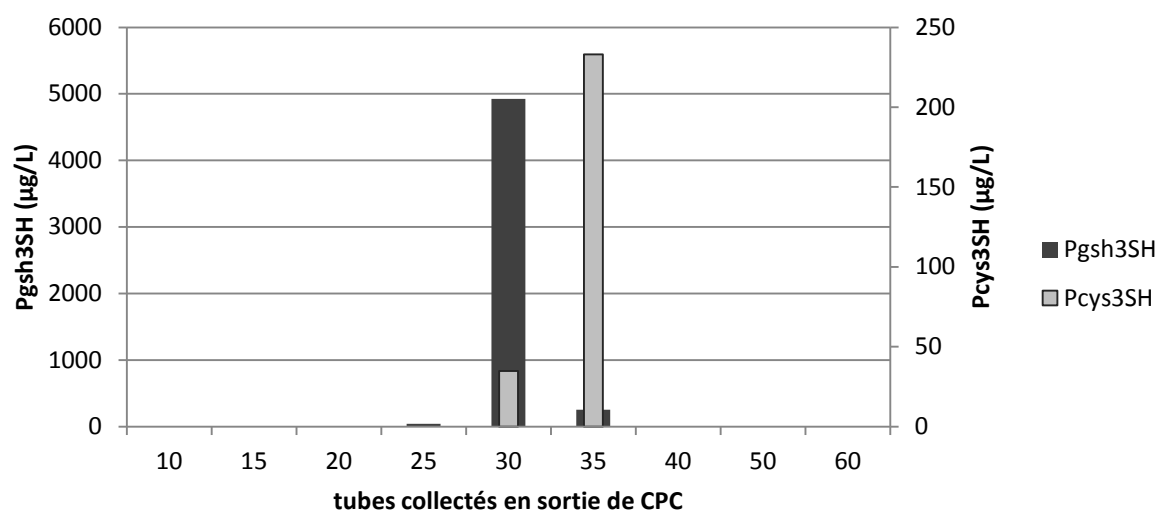


Figure 22 : Dosage des précurseurs cystéinylés et glutathionylés (Pcys3SH et Pgsh3SH) en µg/L, tous les 5 tubes collectés en sortie de CPC

2) Optimisation du fractionnement

Nous venons de voir qu'il est maintenant possible d'isoler des fractions renfermant de nouveaux CPPA par CPC (fraction 41-66, Figure 21). Afin d'avancer dans leur caractérisation, nous avons cherché à les localiser plus finement dans les fractions collectées. Sachant que l'ensemble des fractions dans l'expérience précédente avaient été regroupées et fermentées, nous avons répété le protocole à l'identique (cf. tableau 24) à partir du même extrait (eq. 400mL de moût) et seul, le regroupement final est modifié. Toutefois, seule une fermentation est réalisée afin de détecter au mieux la libération de 3SH.

La répartition des formes précurseurs connues dans les tubes de CPC est la même que lors de l'essai précédent, il est donc possible d'extrapoler et de supposer que les nouvelles formes précurseurs sont présentes autour des tubes 40 à 60 (Figure 22). Un regroupement différent est donc proposé en vue d'affiner nos recherches de nouveau CPPA. Le regroupement des fractions a été réalisé comme suit : 1-12 ; 13-26 ; 27-39 (CPA) ; 40-53 (CPPA-1) ; 54-66 (CPPA-2) ; 67-80 ; 81-93 ; 94-120 ; 121-140 (extrusion-1) et 141-160 (extrusion-2).

Ainsi, le regroupement des tubes contenant les formes connues (CPA) est plus fin afin de vérifier que les CPPA n'étaient pas élués ou co-élués avec les CPA. En effet, il est possible que les CPPA présents dans le regroupement précédent 41-66, ne soient finalement présent que dans le début ou dans la fin de ce regroupement. Ainsi, le regroupement précédent 41-66 est séparé en deux : 40-53 et 54-66.

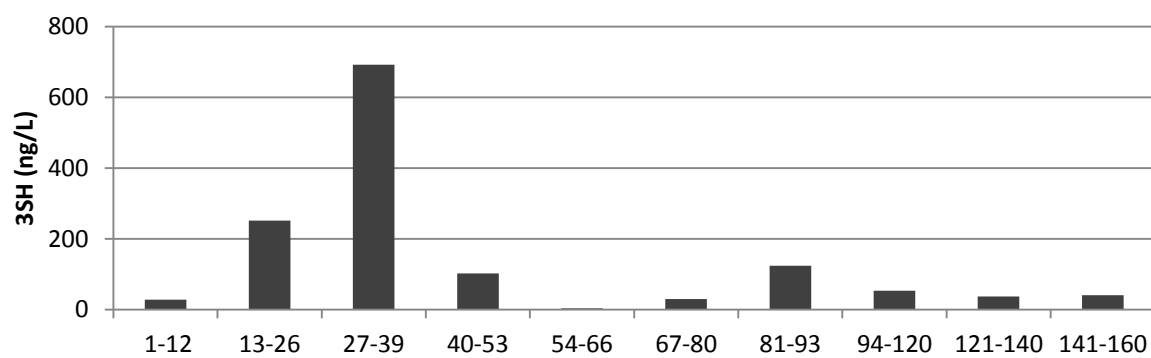


Figure 23 : Dosage du 3SH libéré (ng/L) après fermentation de chaque regroupement des fractions collectées en CPC (n=2)

La somme des teneurs libérées est plus importante dans ce deuxième essai (calculée à 1450 ng/L). Ceci s'explique par le fait que l'ensemble de chaque regroupement est fermenté en une seule fois contrairement à l'essai précédent. Le rendement de fractionnement est d'environ 43%.

Comme lors de l'essai précédent, la fraction contenant les CPA (27-39) permet une libération de 3SH importante représentant plus de 50% du 3SH total calculé (Figure 23).

Il apparaît que la fraction 13-26, contenant de faibles quantités de Pgsh3SH, permet une libération de 3SH de l'ordre de 19 %, une nouvelle forme précurseur est probablement présente. Cette fraction était précédemment assemblée à celles contenant les formes connues, il n'avait donc pas été possible de montrer que la libération de 3SH pouvait être due à d'autres composés.

La fraction 41-66 précédemment obtenue a été, dans cet essai, subdivisée. Il s'avère que seule la fraction 40-53 permet une libération de 3SH après fermentation et compte pour 8 % du 3SH total. Cependant, la libération de 3SH est comparativement plus faible que celle observée dans la fraction 41-66 de l'essai précédent. Il est donc probable que dans l'hypothèse de la présence d'un CPPA, celui-ci est élué alors que les précurseurs cystéinylés ne le sont pas tous. Il y aurait donc un chevauchement de pics.

Enfin, une libération similaire à la fraction 40-53 (environ 9% du 3SH total) est observée dans le regroupement 81-93 ce qui pourrait indiquer la présence d'un autre CPPA de polarité plus élevée que les précédents.

Ainsi, les deux essais ont permis de montrer la présence de CPPA dans les fractions de CPC, toutefois, le rendement de purification en CPC est faible (inférieur à 50%). Des expériences complémentaires seront nécessaires pour expliquer cette perte importante. Celle-ci pourrait être due soit à une dégradation de composés potentiellement précurseurs d'arôme au cours de la CPC soit à une contamination des fractions lors des étapes de purification qui s'opposerait à une libération optimale du 3SH au cours de la fermentation alcoolique.

VIII. Conclusion-Discussion

Dans ce chapitre, nous avons pu démontrer que l'utilisation de la chromatographie de partage centrifuge (CPC) à partir d'un extrait concentré de moût (obtenu par fractionnement sur C18) est une technique puissante et adaptée au fractionnement des précurseurs du 3SH. Celle-ci demande en revanche une optimisation et un ajustement spécifique du système solvant utilisé.

L'optimisation du système solvant est particulièrement délicat dans la recherche de composés inconnus tels que les précurseurs d'arôme puisqu'elle nécessite des étapes supplémentaires de révélation de l'activité des fractions, dans notre cas, l'aptitude à la libération d'arôme au cours d'une fermentation alcoolique.

Grace à l'hypothèse étayée par des expériences préliminaires, que le potentiel en 3SH était constitué de composés de polarité proche des formes initialement identifiées, nous avons pu développer un système solvant en bonne adéquation au fractionnement des précurseurs du 3SH des moûts de Sauvignon blanc. Il s'agit d'un système solvant Butanol/eau ponté par le méthanol en proportion 36,4/10,6/53 et acidifié à pH 2,5.

Par l'utilisation de ce système de solvant, nous avons pu fractionner un extrait de moût obtenu par SPE-C₁₈. Il en résulte la mise en évidence de plusieurs fractions potentiellement précurseur d'arôme (FPPA), révélées par fermentation alcoolique en milieu modèle. Deux d'entre elles sont retrouvées après fractionnement par CPC en amont et en aval des formes précurseurs connues et permettent d'expliquer respectivement une libération de 3SH de l'ordre de 19 et 8% de la libération en 3SH totale calculée.

Ces essais encourageants devront être renouvelés et affinés afin de poursuivre la caractérisation du potentiel en 3SH et d'en identifier sa composante. Cependant, il apparaît essentiel de trouver une alternative à la pré-purification du moût par SPE. En effet, cette étape est extrêmement fastidieuse et difficilement applicable sur un volume important de moût nécessaire à la poursuite de cette étude. La recherche et le développement d'une alternative à la production d'un extrait de moût fait l'objet d'une étude particulière, développée dans la partie suivante.

CHAPITRE 5 : CHROMATOGRAPHIE FLASH : AUTOMATISATION **DU FRACTIONNEMENT SUR PHASE SOLIDE**

La chromatographie Flash est une technique de séparation préparative rapide et peu coûteuse (notamment en comparaison avec l'HPLC) généralement utilisée pour la purification de produits de synthèse organique ou d'extraits naturels. Elle repose sur le principe classique des chromatographies solide-liquide en colonne où les espèces contenues dans l'échantillon vont se séparer en fonction de leurs différentes affinités avec la phase mobile et la phase stationnaire. La séparation n'est bien évidemment possible que si tous les composés ont des propriétés d'adsorption et de désorption différentes entre les phases. La phase solide est de granulométrie grossière à intermédiaire, permettant de travailler à un débit élevé dans la colonne sans augmenter la pression. Le nombre de plateaux théoriques est donc faible. En chromatographie "Flash" ou chromatographie "éclair", l'élution des composés est accélérée à l'aide d'une légère surpression. Elle est généralement automatisée par l'addition d'un module de pompe permettant ainsi de contrôler et de réguler le débit de solvant de 5 à 100 mL/min ($\pm 5\%$), avec une pression maximale de 10-15 bars. L'automatisation permet de réguler en temps réel les proportions de chacun des solvants et donc de travailler en gradient linéaire. Elle est généralement couplée à un collecteur de fraction et à un détecteur UV-visible.

La transposition de notre méthode de pré-purification du moût sur silice greffée en C₁₈ (SPE-C₁₈) en chromatographie Flash automatisée pourrait permettre de pallier le manque de reproductibilité et de précision de la méthode initiale. En effet, nous avons démontré que la SPE-C₁₈ permettait de pré-purifier le potentiel en 3SH des moûts avec un rendement de l'ordre de 70 à 80% à condition de diminuer le volume de moût percolé égal à 3mL par gramme de résine.

Dans cette partie, nous nous sommes attachés à développer la technique de chromatographie Flash automatisée dans le laboratoire et à évaluer son intérêt dans la purification partielle des précurseurs du 3SH.

I. Développement de la technique de chromatographie Flash

La chromatographie Flash automatisée n'était pas une technique existante dans notre équipe. En revanche, nous disposions d'un système "Spot Prep II" (Armen instrument, France) connecté à la CPC comprenant un module avec pompe, injecteur à boucle, détecteur et collecteur de fraction intégré. Cet appareil peut être facilement découplé de la CPC et équipé d'une colonne de chromatographie Flash. L'utilisation en mode Flash nécessite cependant quelques adaptations. Par exemple, le couplage à la CPC nécessite une contre-pression en sortie de colonne de 10bars pour éviter les "coups de béliers" et les bulles d'air induits par l'utilisation de certains solvants. Or les colonnes Flash sont souvent limitées à une pression de 10-15 bars. Par ailleurs, l'ensemble des connectiques reliant la colonne a dû être adapté.

Concernant le choix de la colonne, nous avons, dans un premier temps, privilégié la simplicité d'utilisation et la compatibilité des différents systèmes proposés sur le marché. Un grand nombre de fournisseurs propose des silices greffées en C₁₈. Nous avons retenu les cartouches de type PuriFlash (Interchim, France) prépackées en silice irrégulière greffée en C₁₈ (50µm). Celles-ci présentent un avantage particulier puisque la phase stationnaire est la même que celle que nous utilisons en vrac. Ainsi, la transposition de la méthode SPE-C₁₈ en Flash devrait en être facilitée.

II. Préparation des moûts avant la chromatographie Flash

Afin d'éviter de saturer et de polluer la colonne par des composés à forte adsorption sur C₁₈ (voir fixation irréversible), nous avons décidé de traiter les moûts avant leur injection en chromatographie Flash. Darriet (1993) a démontré que l'utilisation de charbon actif (produit inerte à structure poreuse à fort pouvoir adsorbant) permettait d'éliminer une grande partie des composés phénoliques du moût et donc d'allonger la durée de vie des colonnes, sans pour autant altérer le potentiel en 3SH. Nous avons cherché à vérifier que ce traitement ne modifiait ni le potentiel en 3SH du moût et ni celui de son extrait obtenu par SPE-C₁₈.

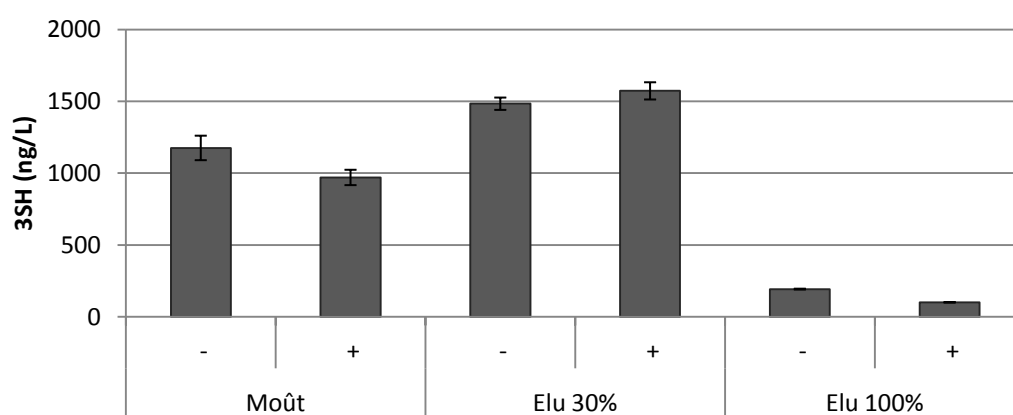


Figure 24 : Comparatif des valeurs obtenues en 3SH après fermentation d'un moût ou de fraction obtenue par C₁₈-SPE de ce même moût, traité ou non au charbon actif. Moût : moût témoin non percolé. Elu30% : fraction d'élution à 30% de méthanol. Elu 100% : fraction d'élution à 100% de méthanol. - : échantillon non traité. + : échantillon traité au charbon actif (n=2)

Le moût est traité à raison de 50g/L de charbon (Charbon Actif Supra 4, Laffort, France). Après agitation 30 minutes à 200rpm, le moût est décanté 48h avant d'être centrifugé, filtré sur membrane de 0,45µm, puis séparé en deux lots équivalents. Une partie est directement fermentée en parallèle du moût témoin.

150 mL de moût traité et 150 mL de moût non traité sont ensuite pré-purifiés en parallèle sur SPE-C₁₈ (50g) selon le protocole décrit précédemment. Deux fractions sont collectées par éluations successives d'une solution de méthanol à 30 et 100%. Chaque fraction est ensuite ajoutée en milieu modèle et soumise à une fermentation.

L'analyse du 3SH libéré après fermentation alcoolique de l'ensemble de cet essai est présentée dans la Figure 24.

Il apparaît que la libération du 3SH est légèrement affectée par le traitement du moût (perte d'environ 15%). En revanche, la teneur en 3SH libéré à partir des fractions SPE-C₁₈ (Elu30% ou Elu100%) est relativement similaire, ce qui nous laisse penser que le traitement au charbon n'a pas d'impact fort sur le potentiel en 3SH des moûts.

III. Adaptation de la chromatographie Flash à la purification partielle des précurseurs du 3SH du moût

1) Etude des performances des colonnes PuriFlash IR C₁₈

Les premiers tests ont été réalisés sur une petite cartouche (PuriFlash IR C₁₈ 20g, Interchrom). Notre objectif était double. Nous cherchions à optimiser la pré-purification du moût afin d'obtenir un extrait brut renfermant l'ensemble du potentiel en 3SH et de vérifier s'il est possible de séparer la fraction préalablement nommée FPPA qui conduisait à une libération de 3SH mais ne contenait pas les précurseurs comme la FPA qui, quant à elle, renferme le Pcys3SH et le Pgsh3SH. En effet, sur SPE-C₁₈, la FPPA contenant les composés potentiellement précurseurs était élue avant le Pcys3SH par un faible pourcentage de méthanol. Les composés recherchés sont donc très vraisemblablement légèrement plus polaires.

Tableau 25 : Conditions de la purification de 150 mM de moût traité au charbon en chromatographie Flash sur PuriFlash IR C₁₈ 20g (7,5 mL/g de silice C₁₈)

	Temps (min)	Débit (ml/min)	Moût	Eau	Méthanol 5%	Méthanol 100%
A						
Conditionnement	00:00	20	0	0	0	100
	10:00	20	0	0	0	100
	20:00	20	0	100	0	0
	30:00	20	0	100	0	0
Percolation	00:00	20	100	0	0	0
	07:50	20	100	0	0	0
Lavage	07:53	20	0	100	0	0
	09:53	20	0	100	0	0
Elution	24:53	20	0	0	100	0
	39:53	20	0	0	0	100
	44:53	20	0	0	0	100

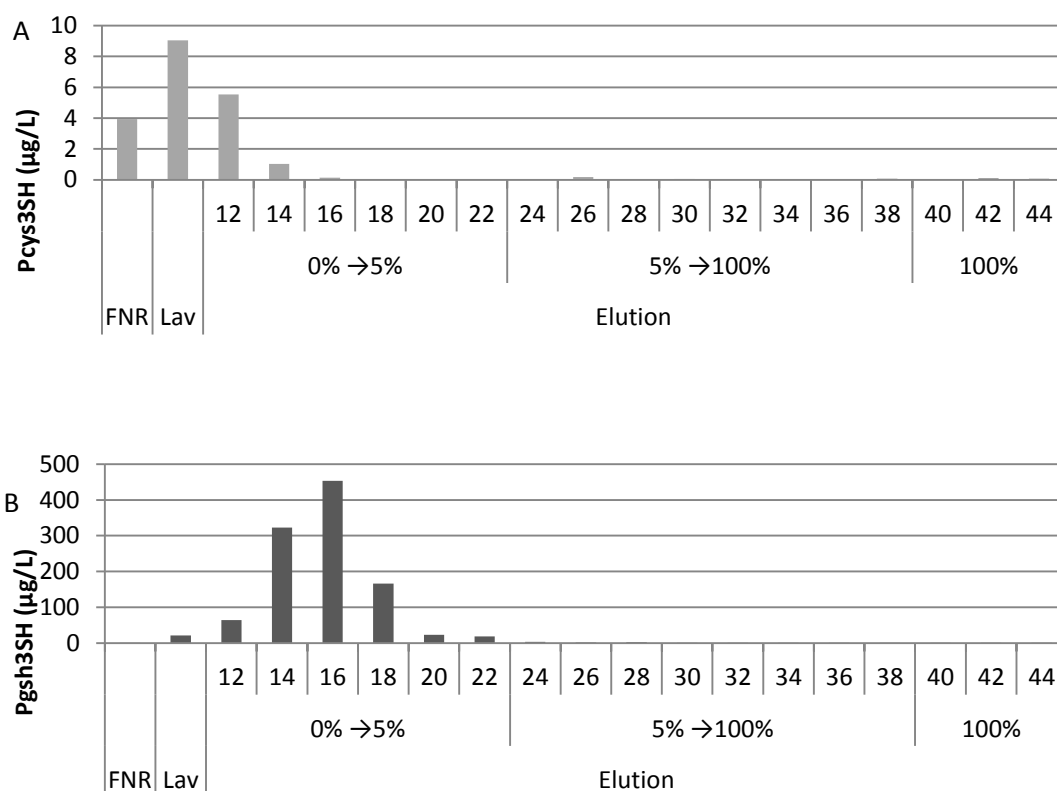


Figure 25 : Répartition des précurseurs cystéinylés (Pcys3SH, en A) et glutathionylés (Pgsh3SH, en B) dans les différentes fractions de chromatographie Flash sur PuriFlash IR C₁₈ 20g. FNR : fraction non retenue. Lav : lavage à l'eau. % de méthanol au cours du gradient d'élution

Dans cet essai préliminaire, 150 mL de moût traité au charbon ont été percolé sur la colonne préalablement conditionnée par 200 mL de méthanol et 200 mL d'eau (soit 7,5mL par gramme de C₁₈). Les composés non retenus sont ensuite éliminés de la colonne par un volume de colonne d'eau (40 mL) et l'élution des composés d'intérêt est réalisée par un double gradient eau-méthanol (Tableau 25). Sachant que les CPPA peuvent être élués de la C₁₈ par moins de 1 % de méthanol et qu'il est difficile de contrôler parfaitement les faibles pourcentages de solvants par les pompes (< 5 %), nous avons préparé une solution de méthanol à 5% afin de contourner ce problème. Ainsi, un premier gradient d'élution couvre de 100% d'eau à 100% d'une solution aqueuse de méthanol à 5% puis de 100% de celle-ci à 100% de méthanol pur (Figure 25). Cette méthode permet ainsi d'affiner le gradient de 0 à 5% de méthanol. La collecte des fractions est réalisée par pas de 20mL, soit un tube par minute. La teneur en Pcys3SH et en Pgsh3SH est estimée un tube sur deux (Figure 25).

Le dosage des précurseurs connus indique qu'une grande partie des précurseurs cystéinylés est présente dans les fractions non retenues et de lavage (Figure 25A). Les précurseurs glutathionylés semblent être légèrement mieux adsorbés sur la résine puisqu'ils sont retrouvés à partir de la fraction de lavage (Figure 25B).

Différentes optimisations ont été testées afin d'améliorer la rétention des composés tels que le débit ou le pré-traitement du moût, mais il apparaît que la percolation du moût sur cette colonne dans ces conditions ne permet pas de purifier le potentiel en 3SH des moûts.

De plus, nous avons démontré que ce type de produit présente :

- (i) une capacité de charge limitée de l'ordre de 1,5 mL de moût par gramme de silice greffée
- (ii) un pouvoir de rétention des composés d'intérêt fluctuant
- (iii) une reproductibilité et répétabilité faible

Ainsi, il semble difficile d'obtenir des extraits de moût par l'utilisation de ce type de cartouche. En revanche la technique de chromatographie Flash n'est pas remise en cause. Elle a permis de diminuer fortement le temps de manipulation (de l'ordre d'un facteur 5 par rapport à la SPE-C₁₈) et de faciliter grandement la mise en œuvre du fractionnement.

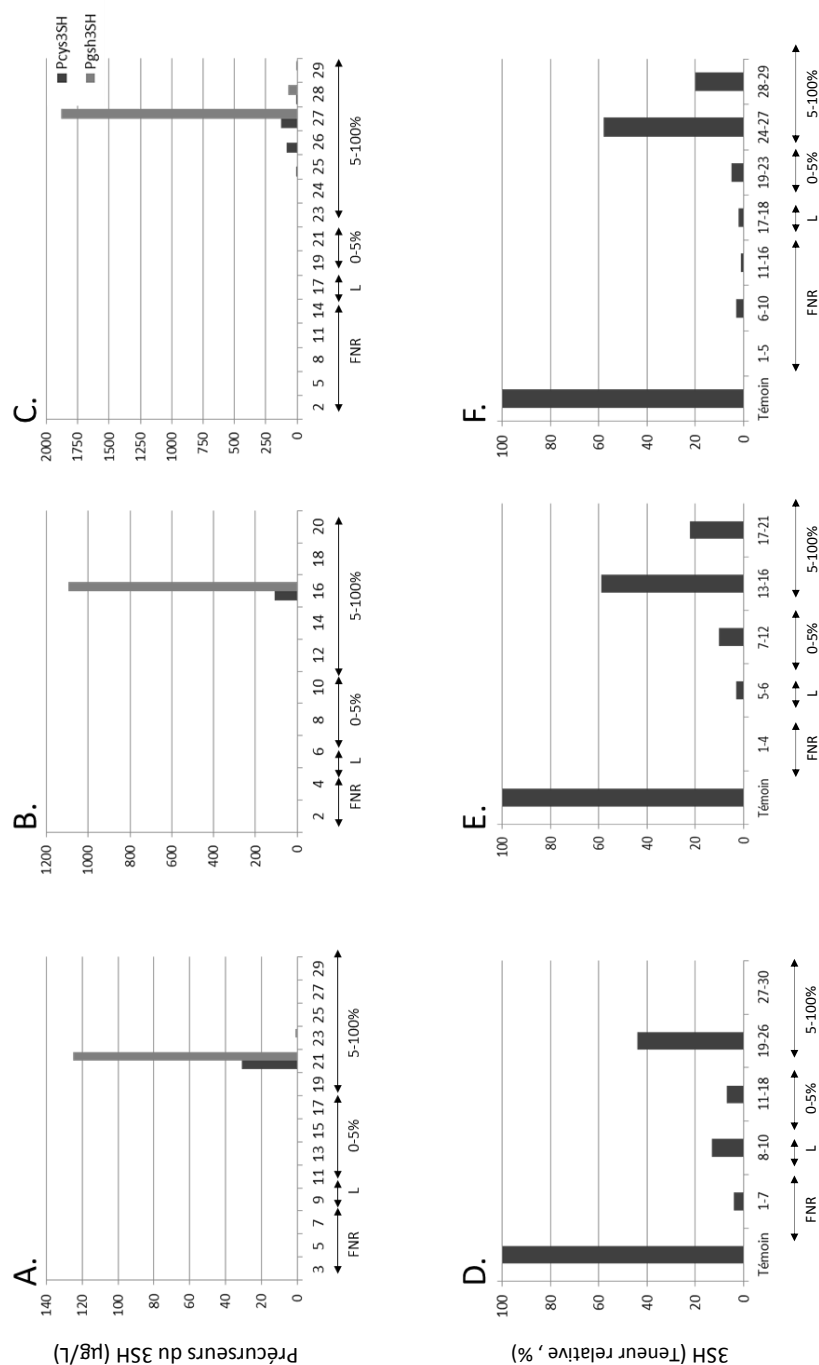


Figure 26 : Analyse des formes précurseurs dans les fractions collectées (A, B et C) et du 3SH correspondant après fermentation (D, E et F) selon la colonne utilisée en chromatographie Flash. A et D correspondent à la percolation de 150 mL de moût sur PF30 C₁₈ aQ-35g (4,3mL/g ; collecte par tube de 25mL), B et E correspondent à la percolation de 40 mL de moût sur Chromabond Flash RS4 C₁₈ec-4g (10mL/g ; collecte par tube de 10 mL) et C et F correspondent à la percolation de 150 mL de moût sur Chromabond Flash RS4 C₁₈ec (37mL/g ; collecte par tube de 10 mL)

2) Etude comparative de C₁₈ de nature et d'origine différentes

Nous avons comparé la silice greffée en C₁₈ prépackée en cartouche fournie par la société MachereyNagel (Chromabond Flash RS C₁₈ec, particules sphériques, diamètre des pores 60 Å, taille des particules 45 µm, surface spécifique 500 m²/g) à une C₁₈-aQ en cartouche de la société Interchim (PF30 C₁₈ aQ, particules sphériques, diamètre des pores 60 Å, taille des particules 15-30 µm, surface spécifique 500 m²/g). Il s'agit d'une résine ayant subi un procédé de post-greffage qui permet à la C₁₈ d'être solvatée par de l'eau, la rendant ainsi plus apte à fixer les composés polaires).

La caractérisation de ces différentes phases est réalisée comme précédemment. Brièvement, un volume de moût préalablement traité au charbon actif est percolé sur la cartouche à 5mL/min, puis l'élution est réalisée par un gradient de méthanol-eau à 10 mL/min. Le Pcys3SH et le Pgsh3SH sont suivis tout au long du fractionnement afin d'affiner le regroupement des fractions, qui seront soumises à une fermentation pour révéler le 3SH potentiel (Figure 26).

Concernant la colonne PF30-C₁₈-aQ, il apparaît que le Pcys3SH et le Pgsh3SH sont bien retenus sur la colonne et sont co-élus par un pourcentage de méthanol de l'ordre de 30 % (Figure 26A). D'après l'analyse du 3SH après fermentation (reflétant le potentiel en 3SH initial, Figure 26D), il apparaît que 44% du 3SH est retrouvé dans la fraction contenant initialement les précurseurs et que les composés non retenus (FNR+Lavage) ne sont responsables que de 17% du 3SH total. La perte du potentiel en 3SH au cours du processus est estimée à 32%.

La cartouche Chromabond Flash RS4 C₁₈ec (4g) a été testée en parallèle. La percolation d'un volume de moût équivalent à 10 mL/g de résine permet d'isoler une et une seule fraction renfermant le Pcys3SH et le Pgsh3SH (Tube 16, Figure 26B). Ces composés sont fortement retenus sur cette silice greffée puisqu'ils sont élués par un pourcentage de méthanol supérieur à 80%. Après fermentation, il apparaît que seul 3% du 3SH initial est libéré à partir des fractions non retenues (FNR+lavage) et que l'élution par un gradient de méthanol a permis de fractionner le potentiel en 3SH (Figure 26E). 59 % du 3SH est révélé à partir de la fraction renfermant le Pcys3SH et le Pgsh3SH. Respectivement, 10 et 22% du 3SH

est retrouvé après fermentation des fractions 7-12 et 17-21 dépourvues de précurseurs connus. La perte du potentiel en 3SH au cours du processus est estimée à 6%.

Enfin, nous avons cherché à déterminer la capacité de charge maximum de la Chromabond Flash RS C₁₈ec (4g). Pour cela, nous avons augmenté le volume de moût percolé à 38 mL/g (Figure 26 C et F). Aucun phénomène de saturation n'est observé. En effet, aucun précurseur connu ni aucune libération de 3SH n'est détectée après fermentation des fractions non retenues (FNR1, 2, 3 et lavage). La distribution du 3SH libéré est très similaire à celle observée précédemment. La perte estimée est de l'ordre de 11% dans ces conditions de travail et malgré le volume percolé la résolution de séparation reste élevée puisque la largeur des pics est inférieure à 10mL.

Tableau 26 : Récapitulatif des rendements de récupération pour chaque C₁₈ testée. Le pourcentage de 3SH non attribué aux formes connues est également précisé sous le terme FPPA (pour fraction potentiellement précurseur d'arômes)

Cartouche	Volume percolé par gramme de silice	Rendement		
		(récupération dans les fractions d'élution)		
		Pcys3SH	Pgsh3SH	3SH (dont x% attribué à une FPPA)
PuriFlash IR C ₁₈ , 20g	7,5mL/g	0	<30%	n.d.
PF30 C ₁₈ aQ, 35g	4,3mL/g	85%	96%	50% (7%)
Chromabond Flash RS4 C ₁₈ ec 4g	37mL/g	75%	89%	83% (5% + 20%)

3) Synthèse des résultats et discussion

L'ensemble des résultats obtenus par chromatographie Flash nous permet d'envisager cette technique comme étape de pré-extraction des composés d'intérêt en vue de leur purification par CPC. Les performances de chaque C_{18} sont présentées dans le Tableau 26. Les rendements de récupération ont été calculés sur la base de l'échantillon témoin, c'est-à-dire en fonction de la teneur initiale du moût en précurseurs connus ou en fonction de la teneur en 3SH libérée dans le vin correspondant.

Le rendement de récupération des précurseurs Pcys3SH et Pgsh3SH est optimal sur la PF30- C_{18} -aQ (respectivement de 85 et 96%) et reste très honorable sur la Chromabond RS4- C_{18} ec (75 et 89 %). En revanche, il est catastrophique sur la PuriFlash (Tableau 26).

Concernant le potentiel en 3SH, c'est-à-dire la quantité calculée de 3SH libérée à partir de l'ensemble de fractions retenues, il apparaît que la Chromabond RS4 présente d'excellentes performances avec une rétention de l'ordre de 83% alors qu'elle n'est que de 50% sur C_{18} -aQ (Tableau 26).

Par ailleurs, il est primordial de s'intéresser à la quantité de moût qu'il est possible de fractionner par gramme de silice. En effet, plus la capacité de charge sera importante, plus notre extrait sera riche en composés d'intérêt ce qui facilitera son étude. Il s'avère que la Chromabond permet de fractionner jusqu'à 37mL de moût par gramme de silice tandis que la silice C_{18} -aQ ne permet de fractionner que 4,3mL par gramme. Il est évident que la Chromabond permettra d'obtenir un extrait plus riche en un seul passage puisque le volume de moût percolé peut être jusqu'à dix fois supérieur.

Enfin, une rétention de l'ensemble des composés associés au potentiel en 3SH est indispensable. De plus, si les formes potentiellement précurseurs inconnues sont séparées des formes connues, alors leur étude sera facilitée. Sur la Chromabond, 25% du 3SH total libéré est d'origine inconnue, ainsi, il est possible que ces fractions contiennent des composés potentiellement précurseurs d'arômes, alors que seulement 7% du 3SH d'origine inconnue a pu être obtenu sur C_{18} -aQ. Ainsi, une plus grande proportion de nouvelles formes précurseurs est présente dans la fraction obtenue par la Chromabond que dans celle

Tableau 27 : Protocole de fractionnement par chromatographie Flash de 5L de moût du millésime 2011

Temps (min)	Débit (mL/min)	Moût Voie A (%)	Eau Voie B (%)	Méthanol Voie C (%)
Conditionnement de la cartouche				
00 :00	100	0	0	100
18 :00	100	0	0	100
27 :00	100	0	100	0
45 :00	100	0	100	0
Injection du moût				
00 :00	100	100	0	0
50 :00	100	100	0	0
Elution				
50 :03	100	0	100	0
60 :00	100	0	100	0
01 :50 :00	100	0	0	100
02 :10 :00	100	0	0	100

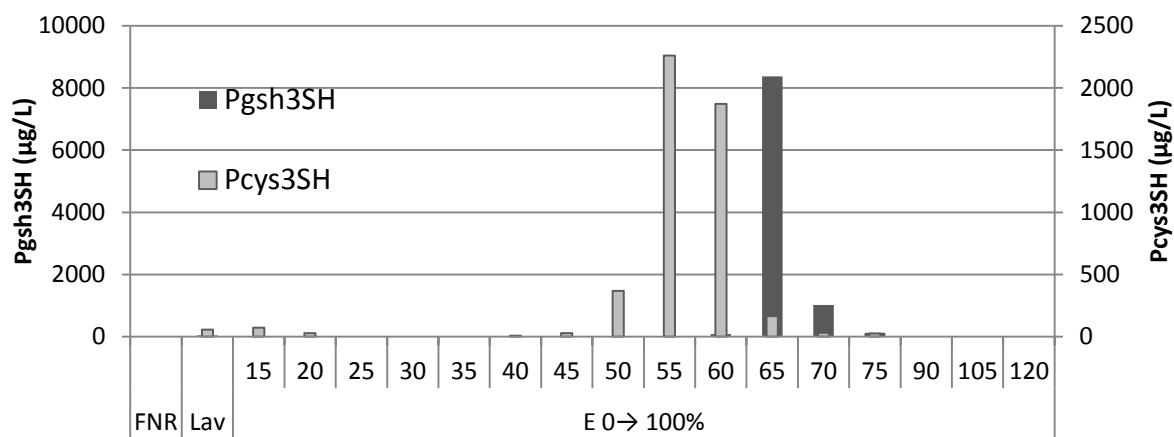


Figure 27 : Répartition des formes précurseurs cystéinyliées et glutathionyliées dans les différentes fractions obtenues par percolation de 5L de moût 2011 en chromatographie Flash sur RS330. L'analyse est réalisée tous les 5 tubes. FNR : fraction non retenue. Lav : lavage à l'eau. % : pourcentage de méthanol lors de l'élution

obtenue avec la C₁₈-aQ. Ceci pourrait également expliquer le rendement de récupération du 3SH supérieur sur Chromabond.

En résumé, la silice Chromabond semble la plus adaptée à l'obtention d'un extrait contenant l'ensemble des formes précurseurs du 3SH (connues comme inconnues).

IV. Application de la chromatographie Flash au fractionnement des précurseurs du 3SH du moût

Maintenant que la phase a été sélectionnée et la méthode optimisée, nous avons transposé les paramètres optimisés en petit volume à plus grande échelle. La méthode de fractionnement est détaillée dans le Tableau 27. Pour cet essai, 5L de moût préalablement traités au charbon actif puis filtrés sur 0,45µm ont été percolés, puis la phase est lavée par un volume de colonne d'eau et enfin l'élution des composés d'intérêt est réalisée par un simple gradient eau-méthanol. Le débit d'analyse est de 100mL/min.

1) Validation de la méthode à l'échelle préparative ; suivi des précurseurs Pcys3SH et Pgsh3SH au cours du fractionnement.

Le fractionnement réalisé avec la cartouche RS330 a permis de séparer efficacement les précurseurs cystéinylés des précurseurs glutathionylés (Figure 27). La distribution est très similaire à celle observée sur la petite cartouche lors des essais préliminaire (RS4). Comme précédemment, les fractions non retenues ne présentent pas de précurseurs, il n'y a donc pas de perte de composés au cours de la percolation. La transposition de la méthode de fractionnement par chromatographie Flash à l'échelle préparative est donc possible.

2) Vérification du seuil de saturation de la colonne

Nous avons voulu vérifier le volume optimal de moût percolé sur la cartouche de RS330. Pour cela, les cinq fractions non retenues successives, correspondant à la percolation

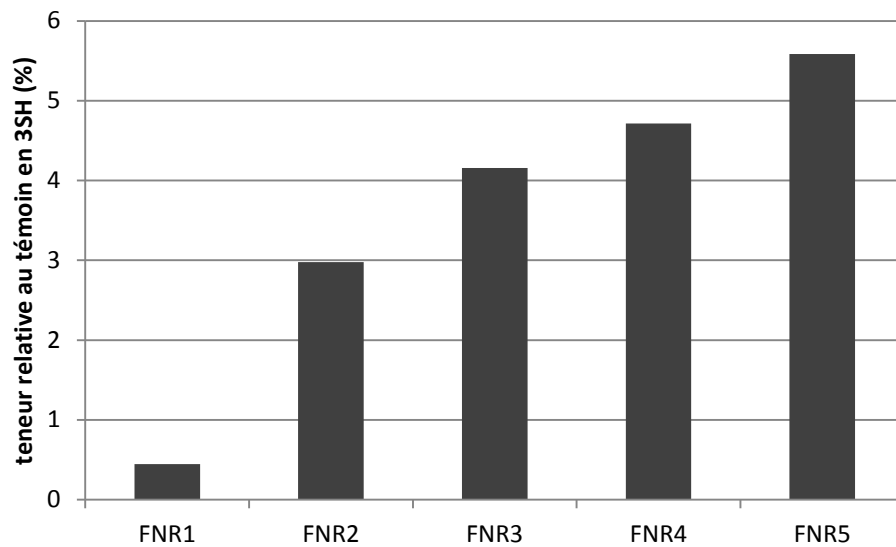


Figure 28 : Teneur en 3SH libéré après fermentation alcoolique des fractions non retenues (exprimée en % de libération par rapport au témoin (100%)). Pour plus de lisibilité le témoin n'est pas représenté sur le graphique. Chaque FNR correspond à 1L de moût percolé

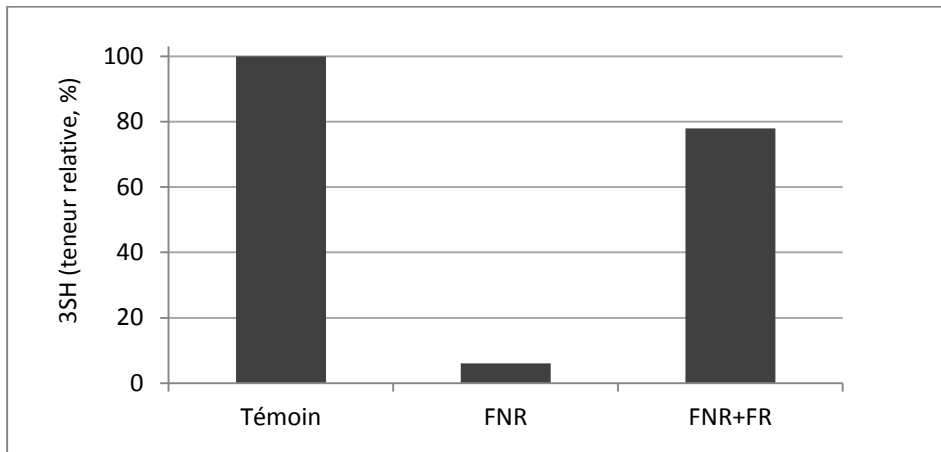


Figure 29 : Teneur en 3SH libéré après fermentation de la fraction non retenue (FNR) et d'une reconstitution du moût après fractionnement obtenue par supplémentation de la FNR par les fractions retenues (FNR+FR), exprimée en pourcentage de libération par rapport au témoin (100%)

des 5L de moût ont été fermentées séparément et le 3SH libéré a été analysé (Figure 28). La FNR1 correspond au premier litre de moût percolé, la FNR2 au deuxième, etc.

Il apparaît que la libération en 3SH augmente avec le nombre de litre de moût percolé. En effet, la perte correspondant au premier litre de moût percolé est inférieure à 1%, alors qu'après 5L percolés, la perte est proche de 6%. Néanmoins, elle reste faible puisqu'inférieure à 6% en fin de percolation.

3) Vérification du taux de récupération du potentiel en 3SH

Chaque étape de purification engendre automatiquement une perte indissociable de la technique affectant le rendement de l'extraction. Par ailleurs, chaque manipulation peut également induire des modifications irréversibles de l'extrait telles que la dégradation de certains composés ou encore une contamination de l'extrait. Ainsi, le biais engendré par la technique doit être systématiquement évalué avant de poursuivre.

Dans cette optique, nous avons effectué une reconstitution du moût après fractionnement et qui a été fermentée en conditions modèles. Les résultats nous permettront de conclure sur le pourcentage de perte lié à la technique utilisée. Pour cela, les FNR ont été assemblées et supplémentées à concentrations équivalentes des fractions retenues (FR) collectées lors de la phase d'élution. Les résultats présentés dans la Figure 29 indiquent que plus de 75% du potentiel en 3SH est retrouvé après fractionnement.

4) Etude de la libération du 3SH au cours du fractionnement par chromatographie Flash

Etant donné que le volume de moût percolé sur la silice est de 5L, seul 5 % de chaque fraction est fermenté, soit l'équivalent de 250mL de moût. La libération de 3SH au cours de la fermentation est exprimée en pourcentage relatif au témoin en tenant compte du fait que seule une partie de l'extrait est utilisée.

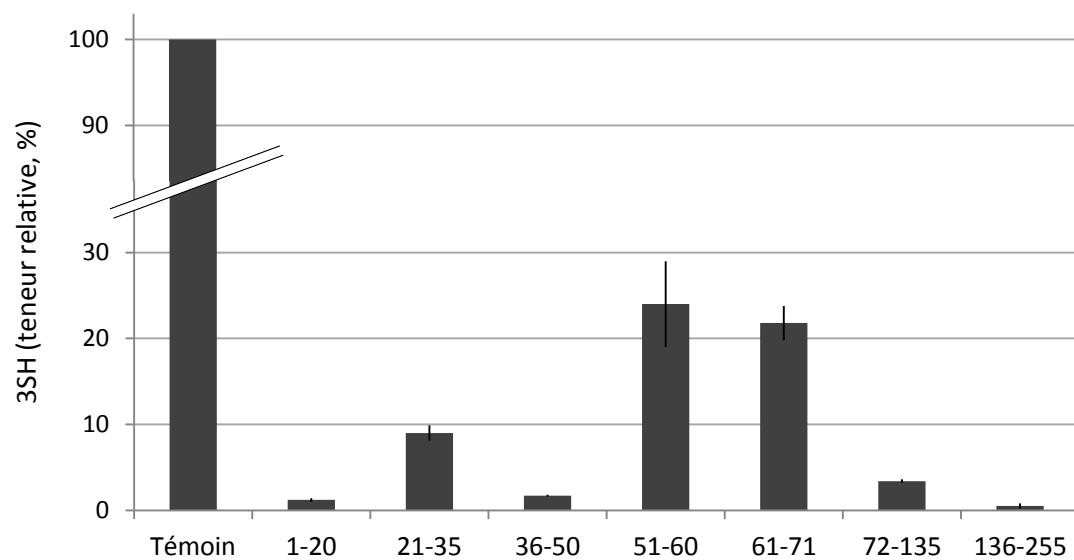


Figure 30 : Teneur en 3SH libéré après fermentation des fractions obtenues par chromatographie Flash sur RS330, exprimée en pourcentage de libération par rapport au témoin (100%)

Un regroupement des fractions a été réalisé avant fermentation alcoolique sur la base des expériences préliminaires et en fonction de l'élution du Pcys3SH et du Pgsh3SH (Figure 30). A première vue, nous pouvons noter que le potentiel en 3SH du moût a été séparé au cours de l'élution en chromatographie Flash. Deux regroupements présentent un taux de libération important, il s'agit de l'assemblage des fractions 51-60 et 61-71 qui renfermaient respectivement le Pcys3SH et le Pgsh3SH. Dans cet essai, une corrélation positive est donc observée entre la présence de précurseurs et la libération du 3SH. Par ailleurs, la fermentation de deux autres fractions conduit également à une révélation en thiol volatil de l'ordre de 9 et 3,4% de la teneur initiale. Ainsi, il semblerait qu'au moins deux autres composés puissent participer dans une moindre mesure à la libération du 3SH dans les vins.

V. Conclusions

Les nombreuses optimisations ont permis de sélectionner une silice greffée en C₁₈ retenant efficacement l'ensemble des composés précurseurs du 3SH (les formes connues et inconnues). Il est alors possible de fractionner les précurseurs de 5L de moût par chromatographie Flash grâce à l'utilisation de la cartouche Chromabond Flash RS 330.

En résumé, la rapidité et la praticité de cette technique en font une méthode de choix. Au lieu d'une semaine pour récupérer les précurseurs du 3SH d'1,5L de moût en SPE-C₁₈, il faut dorénavant une seule journée pour les extraire de 5L. Ce système permet également de réaliser un gradient d'élution et donc une meilleure séparation des composés. Enfin, le système de collecteur de tubes permet de collecter de manière reproductible les différentes fractions.

PARTIE 2, ETUDE ET IMPACT DES PRECURSEURS DU 3SH

CHAPITRE 6 : MISE EN EVIDENCE ET ETUDE DE DIFFERENTS COMPOSES PARTICIPANT AU POTENTIEL EN 3SH

Le chapitre précédent conforte l'hypothèse de l'existence, dans les moûts de Sauvignon, d'autres précurseurs du 3SH que les formes cystéinylées et glutathionylées déjà bien connues.

Avant de nous lancer dans la purification et l'identification de ces "nouveaux" précurseurs du 3SH dans les moûts de Sauvignon, nous avons formulé quelques hypothèses sur leur nature chimique.

Nous avons envisagé dans un premier temps le rôle des composés en C₆, qui, réagissant avec un thiol tel que l'H₂S, peuvent former le 3SH (Schneider *et al.*, 2006, Harsch *et al.*, 2013). Dans un second temps, nous nous sommes consacrés à la caractérisation et à l'identification de deux nouvelles formes S-conjuguées potentiellement précurseur du 3SH. Nous démontrerons également que ces composés sont à l'origine d'une formation de 3SH lors de la fermentation alcoolique. Leur contribution à la libération du 3SH final dans les vins est également précisée.

I. Impact des composés insaturés en C₆ dans la formation du 3SH

Les voies de formation du 3SH, autres que celles impliquant les S-conjugués, font l'objet de nombreuses études. Les composés insaturés en C₆ sont des composés volatils majeurs dans le moût. Ils se forment lors du foulage de la vendange par l'intervention des lipoxygénases à partir des acides gras des lipides membranaires (Hatanaka 1993 ; Hamilton-Kemp *et al.*, 2003 ; Myung *et al.*, 2006). Les aldéhydes insaturés tel que le *trans*-2-hexenal sont particulièrement aptes à subir une réaction d'addition électrophile en position 3 et peuvent donc se combiner aux groupements SH libres.

Peyrot des Gachons (2000a) a été la première à démontrer que la réaction de l'H₂S, produit par la levure au cours de la fermentation, et des composés en C₆ était une voie très

minoritaire de formation du 3SH puisqu'elle est à l'origine de 1 à 10 ng/L du 3SH libéré dans les vins. Schneider *et al.* ont poursuivi cette étude dans le moût par addition d'un analogue marqué du *trans*-2-hexenal (Schneider *et al.*, 2006). La libération de 3SH marqué après fermentation indique que cette voie de formation contribuait à environ 10 % du 3SH total libéré dans les vins.

En 2013, une nouvelle étude est publiée dans ce domaine (Harsch *et al.*, 2013). Les auteurs démontrent que l'ajout d'une forte quantité de sulfure d'hydrogène dans le moût en présence des composés insaturés en C₆ permet d'augmenter considérablement la libération de 3SH par la levure. Ils ont émis l'hypothèse que l'H₂S produit par la levure peut réagir sur le *trans*-2-hexenal et le *trans*-2-hexenol du moût pour former du 3SH. La synthèse de l'H₂S par les levures au cours de la fermentation débute lorsque les sucres commencent à être convertis en alcool. A ce stade, la majorité du *trans*-2-hexenal et *trans*-2-hexenol est déjà convertie dans les formes non-réactives hexan-1-al et hexan-1-ol (Harsch *et al.*, 2013). C'est pourquoi, d'après les auteurs, le fait de supplémenter le milieu de fermentation en hydrogénosulfure de sodium (NaSH) permettrait d'agir directement sur ces deux composés avant leur transformation en hexan-1-al et hexan-1-ol. En effet, la fenêtre de formation du 3SH par cette voie serait relativement étroite.

La formation du 3SH par cette voie serait donc limitée par la teneur en H₂S. Ainsi, pour qu'il y ait synthèse de 3SH par cette voie, l'H₂S doit être libéré avant que les composés insaturés en C₆ soient épuisés du milieu. Sachant que la teneur maximum de ces composés dans les moûts de Sauvignon blanc est de l'ordre de quelques dizaine voire centaines de µg/L pour le *trans*-2-hexenal et de moins de 10 µg/L d'H₂S, alors le rendement de la réaction d'addition doit être élevé pour que ces composés participent significativement à la libération de 3SH dans les vins.

Pour vérifier la probabilité de certaines de ces hypothèses, nous avons étudié l'impact de l'addition de NaSH, et/ou de *trans*-2-hexenal et *trans*-2-hexenol, à un moût et à un milieu modèle sur la libération de 3SH au cours de la fermentation alcoolique. Le taux de biotransformation de ces composés en 3SH au cours de la fermentation et leur contribution ont été estimés.

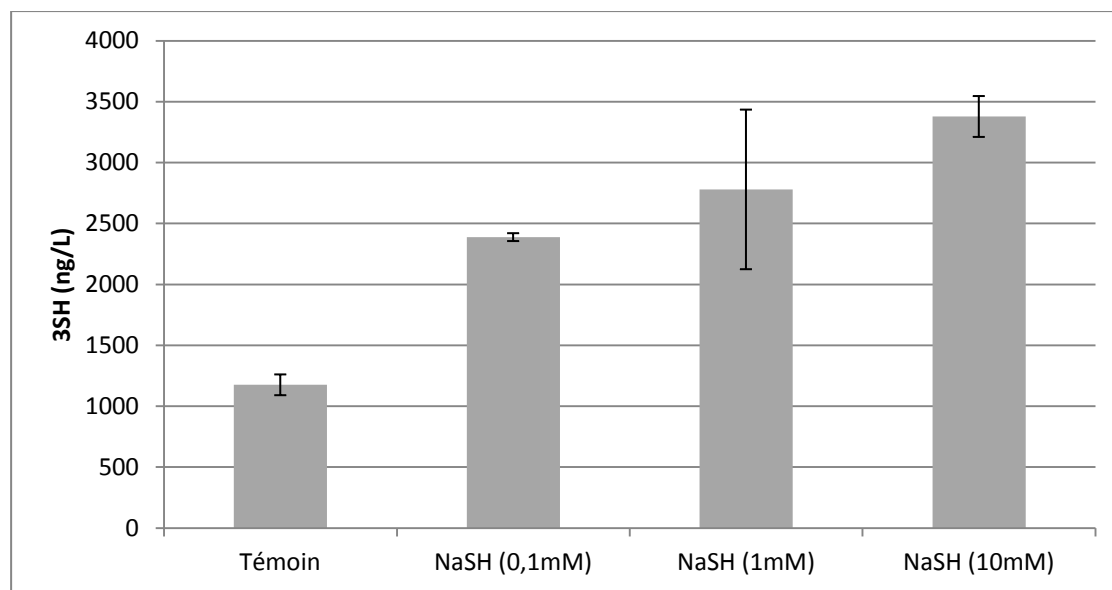


Figure 31 : Libération de 3SH après fermentation d'un moût additionné de NaSH (0,1mM, 1mM, 10mM) avant fermentation (n=2)

1) Corrélation entre la quantité en sulfure d'hydrogène introduite et la libération de 3SH

Nous avons d'abord cherché à reproduire dans nos conditions expérimentales, les résultats précédemment publiés, montrant une importante libération de 3SH en présence de NaSH et/ou du *trans*-2-hexenal et *trans*-2-hexenol.

Le but est ici de déterminer s'il existe une relation de proportionnalité entre la quantité de NaSH ajoutée et la concentration en 3SH et cela indépendamment du *trans*-2-hexenal et *trans*-2-hexenol. Pour cela, le sulfure d'hydrogène a été introduit soit avant, soit 48 heures après ensemencement, aux concentrations utilisées par Harsch *et al.* (0,1 ; 1 et 10 mM). En conditions œnologiques, la teneur en H₂S retrouvée dans le vin est de l'ordre du µg/L soit quelques dizaines de nM (Maujean *et al.*, 2001). Au-delà de ces valeurs, le vin est fortement marqué par des notes de réductions nauséabondes. Ainsi l'addition de NaSH correspond à des concentrations 1000, 10 000 et 100 000 fois plus importantes de celles retrouvées dans les vins.

L'analyse du 3SH libéré dans les vins est présentée dans la Figure 31. Une augmentation des teneurs en 3SH est observée lors d'un ajout de NaSH dans le milieu. En revanche, l'augmentation d'un facteur 100 de la quantité en NaSH introduite n'induit pas d'augmentation significative de la libération du 3SH.

En contexte œnologique, l'addition de NaSH conduirait donc à une libération de 3SH de moins d'un ng/L et ceci en conditions de production maximale de l'H₂S par les levures (100 nM).

Dans un second temps, nous avons également vérifié que cette libération de 3SH à partir du NaSH est bien due à une réaction biologique (levure dépendante) et non à une simple réaction chimique dont l'équilibre aurait été déplacé par la forte addition de NaSH. Afin de s'affranchir du rôle de la levure, des modalités « moût » et « milieu modèle » (MM)

Tableau 28 : Libération du 3SH après fermentation alcoolique ou après 72 heures à 24°C. Chaque modalité est supplémentée avec 1mM de NaSH (soit 10 000 fois la teneur maximum en H₂S par les levures œnologiques). Les essais 1 à 3 sont réalisés soit à partir de la matrice moût et les essais 4 à 6 en milieu modèle (MM)(n=2). Nd : non détecté

Essai	Matrice	Composition	Fermentation	3SH libéré (ng/L)
1	Moût	-	+	3951 ± 814
2	Moût	-	-	119 ± 25
3	Moût	Ethanol (12%)	-	158 ± 18
4	MM	Pcys3SH (10µg/L)	-	104 ± 35
5	MM	Pgsh3SH (100µg/L)	-	<i>nd</i>
6	MM	-	+	<i>nd</i>

stériles ont été conservées 72 heures à 24°C en agitation. En parallèle, le milieu modèle a été additionné de Pcys3SH ou de Pgsh3SH à des concentrations proches de celles habituellement retrouvées dans les moûts (soit respectivement 10 et 100 µg/L). L'ensemble des modalités est additionné de 1mM de NaSH à t0 (soit 10 000 fois la teneur en H₂S libéré par les levures au cours d'une fermentation alcoolique « normale »). Nous avons également réalisé deux modalités fermentées (moût et MM) et un témoin contenant le moût non fermenté et additionné de 12 % d'éthanol. Le 3SH a été dosé après fermentation pour les modalités ensemencées ou après 72 heures pour les modalités conduites en absence de levure.

Comme attendu, sans levures, dans les modalités 2, 3 et 4, la libération de 3SH est extrêmement faible voire nulle (Tableau 28). Dans la modalité 4, le NaSH semble capable d'agir légèrement sur les précurseurs cystéinylés mais cela reste anecdotique vu les concentrations en NaSH utilisées. A l'inverse, aucune libération de 3SH n'est observée dans le milieu modèle seul ou supplémenté en Pgsh3SH.

La levure joue un rôle indispensable dans la libération du 3SH. Ce qui confirme que c'est l'activité vitale de la levure au cours de la fermentation alcoolique qui révèle l'arôme variétal des vins de Sauvignon blanc à partir des formes S-conjugués précurseurs.

2) Etude de l'interaction entre le NaSH et le *trans*-2-hexenal et le *trans*-2-hexenol

Le but est à présent de déterminer sur quels types de molécules le NaSH est capable d'agir. L'hypothèse émise par l'équipe de Harsch *et al.* (2013) concerne le *trans*-2-hexenal et *trans*-2-hexenol. Des concentrations similaires à celles utilisées par Harsch de ces deux composés (1mM) sont ajoutées dans un moût en présence de 1mM de NaSH (tableau 28). Sachant que dans les moûts de Sauvignon blanc, les teneurs en *trans*-2-hexenal sont en moyenne de 50 µg/L (500 nM) et celle en *trans*-2-hexenol entre 100 et 200 µg/L (soit 1 à 2 µM) alors les teneurs en C₆ supplémentées dans cet essai sont 1000 à 2000 fois supérieures à la réalité œnologique (Capone *et al.*, 2012).

Tableau 29 : Etude de l'effet de l'addition conjointe du NaSH (1mM, 10 000X) et des composés en C₆. Les tests sont réalisés sur du moût de Sauvignon blanc supplémenté en *trans*-2-hexenal (1mM, 2000X) ou *trans*-2-hexenol (1mM, 1000X) (n=2)

Essai	Composés (1mM)	NaSH	3SH libéré (ng/L)
1	-	-	1 082 ± 56
2	-	1mM	3 136 ± 404
3	<i>trans</i> -2-hexenal	-	5 595 ± 890
4	<i>trans</i> -2-hexenal	1 mM	265 090 ± 1 250
5	<i>trans</i> -2-hexenol	-	5 220 ± 185
6	<i>trans</i> -2-hexenol	1 mM	88 590 ± 6 540

Tableau 30 : Taux de conversion du *trans*-2-hexenal et du *trans*-2-hexenol en 3SH

	<i>trans</i> -2-Hexenal	<i>trans</i> -2-Hexenol
Taux de conversion en 3SH (%)	0,003	0,003

Les résultats confirment le rôle essentiel du sulfure d'hydrogène dans la libération de 3SH à partir du *trans*-2-hexenal et du *trans*-2-hexenol (Tableau 29). En effet, à quantité comparable en *trans*-2-hexenal et *trans*-2-hexenol, la libération de 3SH dans le vin est augmentée d'un facteur 50 lors d'un apport de NaSH. Les rendements de conversion des composés en C₆ en 3SH, en présence de NaSH, sont de 0,2% pour le *trans*-2-hexenal et de 0,06% pour le *trans*-2-hexenol.

En conditions réelles de fermentation, c'est à dire en absence de NaSH, les taux de conversion de ces composés en C₆ sont abaissés à 0,003% (Tableau 30). Ainsi, la libération du 3SH à partir de ces composés peut être estimée à moins de 1ng/L soit une participation plus que négligeable de ces composés à la libération 3SH dans les vins.

3) Conclusion

En conditions expérimentales très éloignées des conditions œnologiques, la réaction du sulfure d'hydrogène apporté par le NaSH sur le *trans*-2-hexenal ou le *trans*-2-hexenol peut conduire à une libération de 3SH au cours de la fermentation. Le rendement de la réaction est faible. Nous l'estimons à 0,6%.

En conditions œnologiques, la production d'H₂S par la levure est notoirement insuffisante pour permettre une libération significative de 3SH à partir du *trans*-2-hexenal ou du *trans*-2-hexenol. En effet, nous démontrons que le rendement de bioconversion de ces composés au cours de la fermentation alcoolique est de l'ordre de 0,003%. Sachant que les teneurs maximales en *trans*-2-hexenal dans un moût de Sauvignon blanc sont de l'ordre de 50 µg/L, alors moins de 1 ng/L de 3SH serait formé par cette voie dans les vins.

La contribution du *trans*-2-hexenal ou du *trans*-2-hexenol et de l'H₂S à la libération du 3SH au cours de la fermentation alcoolique est donc négligeable. Il est donc abusif de considérer comme Harsch *et al.* (2013) que le *trans*-2-hexenal et le *trans*-2-hexenol du moût soient de « nouveaux précurseurs » du 3SH des vins de Sauvignon.

II. Mise en évidence de nouvelles formes précurseurs du 3SH

Chez certaines plantes, les S-conjugués à la cystéine sont des intermédiaires chimiques produits par dégradation des S-conjugués au glutathion correspondants. Ces composés sont impliqués dans les voies de détoxification ; en premier lieu, les composés toxiques sont conjugués au glutathion par une glutathion S-transférase (Kishimoto *et al.*, 2005), puis subissent l'action de deux enzymes, la γ -glutamyltranspeptidase (élimination de l'acide glutamique), et une carboxypeptidase (élimination de la glycine) (Wolf *et al.*, 1996). Ces réactions enzymatiques sont à l'origine de S-conjugués à la cystéine.

Par ailleurs, une étude publiée en 2011 par Thibon *et al.* a permis de confirmer que le précurseur cystéinylé était obtenu par clivage du précurseur glutathionylé, lui-même étant obtenu par conjugaison du glutathion sur le *trans*-2-hexenal (Thibon *et al.*, 2011b). L'hypothèse proposée est que les intermédiaires de réaction de la formation du S-conjugué au glutathion pouvaient être eux-mêmes précurseurs.

1) Etude de la contribution au potentiel en 3SH d'un intermédiaire de réaction : le S-3-(hexan-1-al)-glutathion

La conjugaison chimique ou enzymatique du glutathion sur le *trans*-2-hexenal conduit dans un premier temps à la synthèse du S-3-(hexan-1-al)-glutathion (dénommé " Pgsh3SH-Al " dans la suite de l'exposé) (Thibon *et al.*, 2011b), qui, par une réaction de réduction de la fonction aldéhydique en alcool est à l'origine du S-3-(hexan-1-ol)-glutathion (Pgsh3SH) (Schéma 2). Ainsi, il existe un intermédiaire de réaction qui pourrait être présent dans les moûts et hypothétiquement participer au potentiel en 3SH. Si tel est le cas, il doit être possible de retrouver ce composé dans les moûts de Sauvignon ou dans les fractions préalablement obtenues par chromatographie Flash.

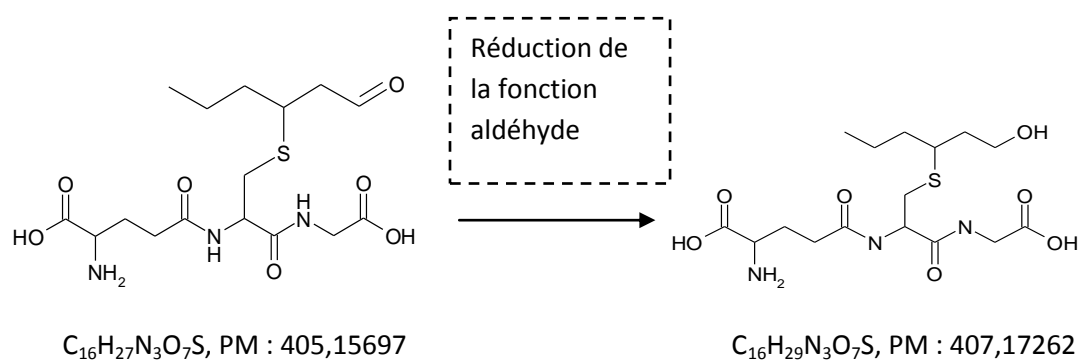


Schéma 2 : Structure du S-3-(hexan-1-al)-glutathion (composé potentiellement précurseur d'arôme, Pgsh3SH-Al), réduit en S-3-(hexan-1-ol)-glutathion (Pgsh3SH)

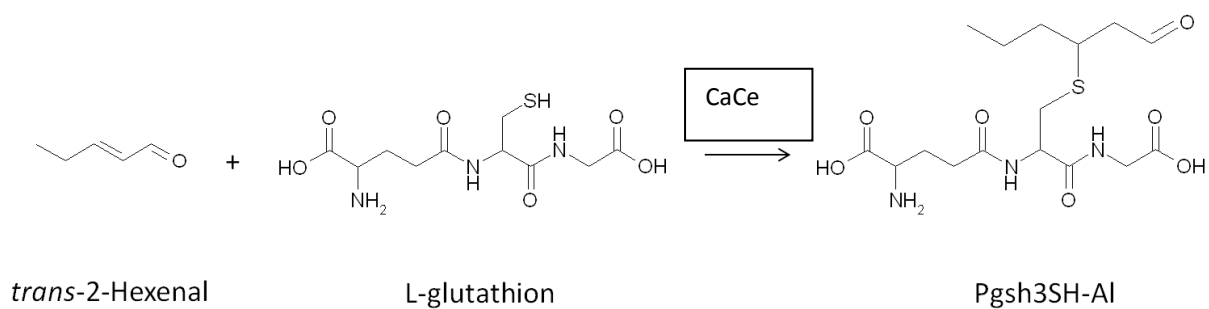


Schéma 3 : Synthèse du S-3-(hexan-1-al)-glutathion

1.1) Synthèse du S-3-(hexan-1-al)-glutathion

La synthèse du Pgsh3SH-Al peut être facilement réalisée par addition de Michael du glutathion sur un aldéhyde de type α - β -insaturé. Elle permet d'accéder au composé en une seule étape (Schéma 3). Cette méthode est classiquement utilisée au laboratoire et dans d'autres équipes comme première étape lors de la synthèse du Pgsh3SH (Roland *et al.*, 2010d ; Thibon *et al.*, 2011b). Dans le but d'optimiser la réaction d'addition, nous avons étudié l'influence de la présence d'une base au cours de réaction d'addition sur la pureté et le rendement de réaction.

5 mmol de *trans*-2-hexenal sont additionnés à une solution en agitation contenant 4 mmol de glutathion en présence de 2 mmol de carbonate de césium ou de 1mmol d'HCl, dans de l'eau ultrapure. Le mélange est agité toute la nuit à température ambiante. Elle est ensuite extraite avec du diéthyl éther (2*30mL) dans le but d'éliminer l'excès de *trans*-2-hexenal.

La détermination de la pureté du Pgsh3SH-Al est réalisée par une analyse en LC-MS du produit de la réaction sur une colonne Synchronis C₁₈ (Synchronis C₁₈ column, 1,7 μ m, Thermo Scientific). La méthode LC-MS utilisée consiste en un gradient continu d'acétonitrile de 5 à 95 % avec un enregistrement sur une gamme de masse allant de 80 à 1000 uma en mode positif. Le signal des ions totaux correspondant à l'intensité de l'ensemble des masses détectées permet de mettre en évidence d'éventuels contaminants et leur quantité relative (Figure 32). L'addition de carbonate de césium ne semble pas utile pour l'addition du glutathion sur le *trans*-2-hexenal, car le rendement de réaction est similaire en son absence (résultats non présentés).

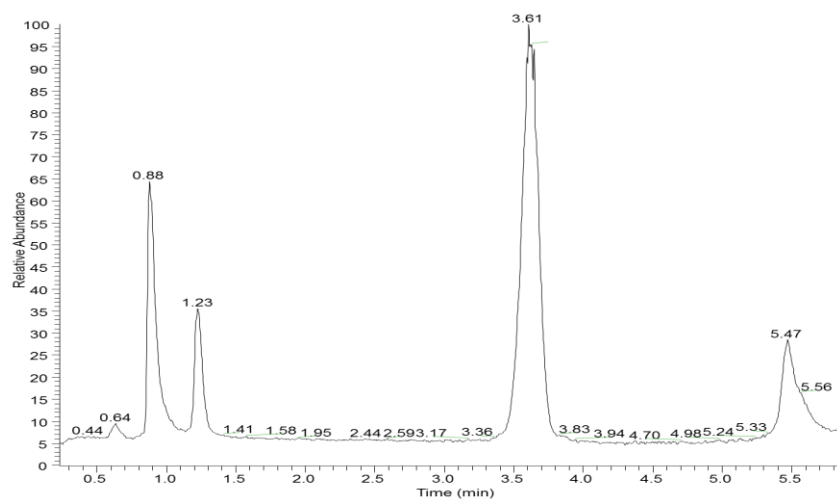


Figure 32 : Chromatogramme en LC-MS des ions totaux du Pgsh3SH-Al de synthèse (gamme de masse enregistrée 80-1000uma)

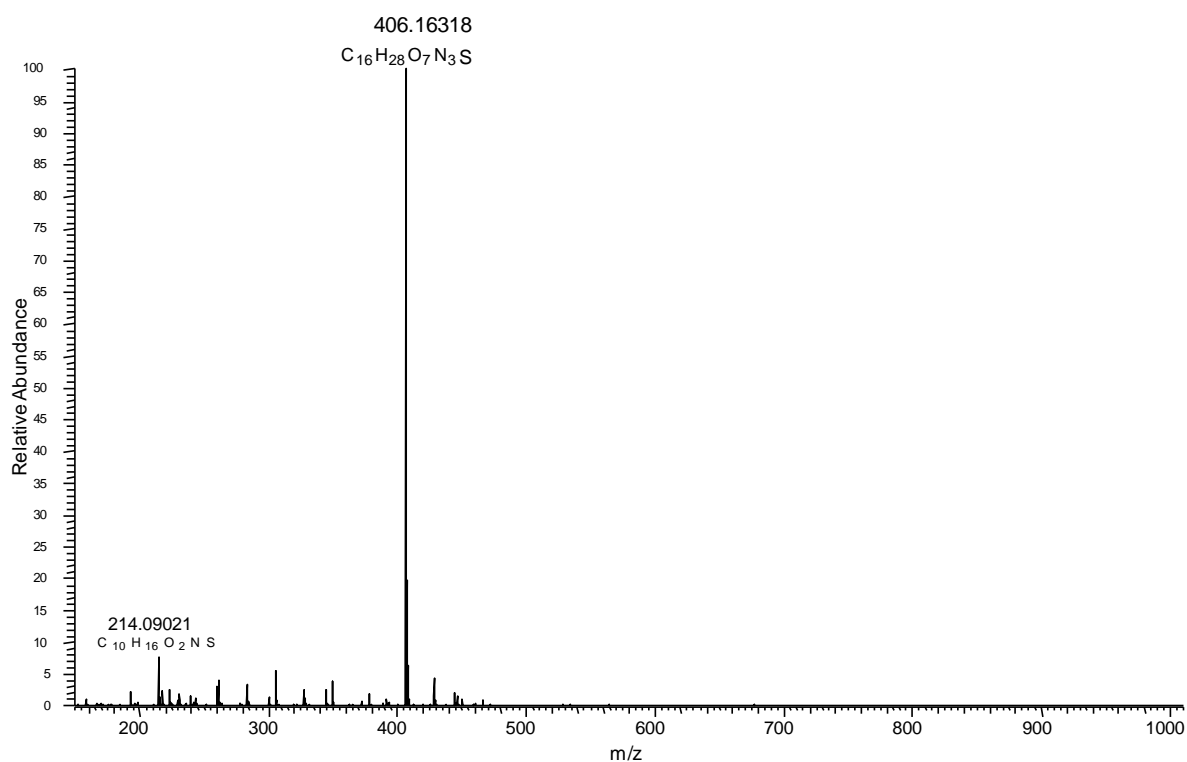


Figure 33 : Spectre de masse du Pgsh3SH-Al de synthèse en mode positif

Le spectre de masse, présenté à la Figure 33, est constitué d'un ion quasi-moléculaire majoritaire monochargé à m/z 406,1632. La mesure de la masse exacte permet de confirmer que le composé a pour formule brute $C_{16}H_{27}N_3O_7S$, il s'agit donc bien du Pgsh3SH-Al.

Le rendement de réaction est proche de 64 % dans nos conditions et le pourcentage de pureté du Pgsh3SH-Al est de l'ordre de 68 % (Figure 32). Deux principaux composés sont à l'origine de la contamination. Il s'agit du glutathion libre associé aux pics à 0,88 et 1,23 minutes (attribution confirmée par leur spectre de masse présentant l'ion quasi-moléculaire monochargé de type $[M+H]^+ = 308,0916$ et l'ion dimère $[2M+H]^+ = 615,1765$) et un composé à 5,47 minutes présentant un ion majoritaire de m/z 354,2859. La structure de ce composé est inconnue. Quoiqu'il en soit ce composé contaminant est en faible concentration et induit une contamination de l'ordre de 10%.

La structure du Pgsh3SH-Al a également été confirmée en dérivant la fonction aldéhydique par de l'hydroxylamine (oxime HA) ou du 2,4-dinitrophénylhydrazine (oxime DNPH). L'analyse des produits de dérivation par LC-MS en mode positif confirme la présence d'un pic majoritaire présentant respectivement l'ion quasi-moléculaire à m/z 421,1748 (HA) et à m/z 586,0916 (DNPH) attendu (spectres non présentés).

1.2) Identification et caractérisation du S-3-(hexan-1-al)-glutathion

1.2.1) Recherche par la masse exacte du S-3-(hexan-1-al)-glutathion dans le moût

La méthode de purification partielle des S-conjugués du moût en vue de leur quantification étant peu sélective (cf. matériels et méthodes), nous avons d'abord recherché le S-3-(hexan-1-al)-glutathion dans ces extraits par sa masse exacte et son temps de rétention. Pour cela, 5 moûts de Sauvignon blanc d'origines et de millésimes différents ont été extraits et analysés par LC-MS (colonne utilisée: Synchronis C_{18} Aq, 100 x 2,1mm ; 1,7 μ m, Thermo Scientific). La figure 6 présente les deux chromatogrammes de l'ion à m/z 406,1643 obtenus à partir du Pgsh3SH-Al de synthèse et d'un extrait de moût. Un composé possédant la même masse moléculaire (même formule brute) et le même temps de rétention que le Pgsh3SH-Al est détecté dans les extraits. L'analyse de ces extraits et du produit de synthèse a également été réalisée sur une deuxième colonne analytique de phase différente de la

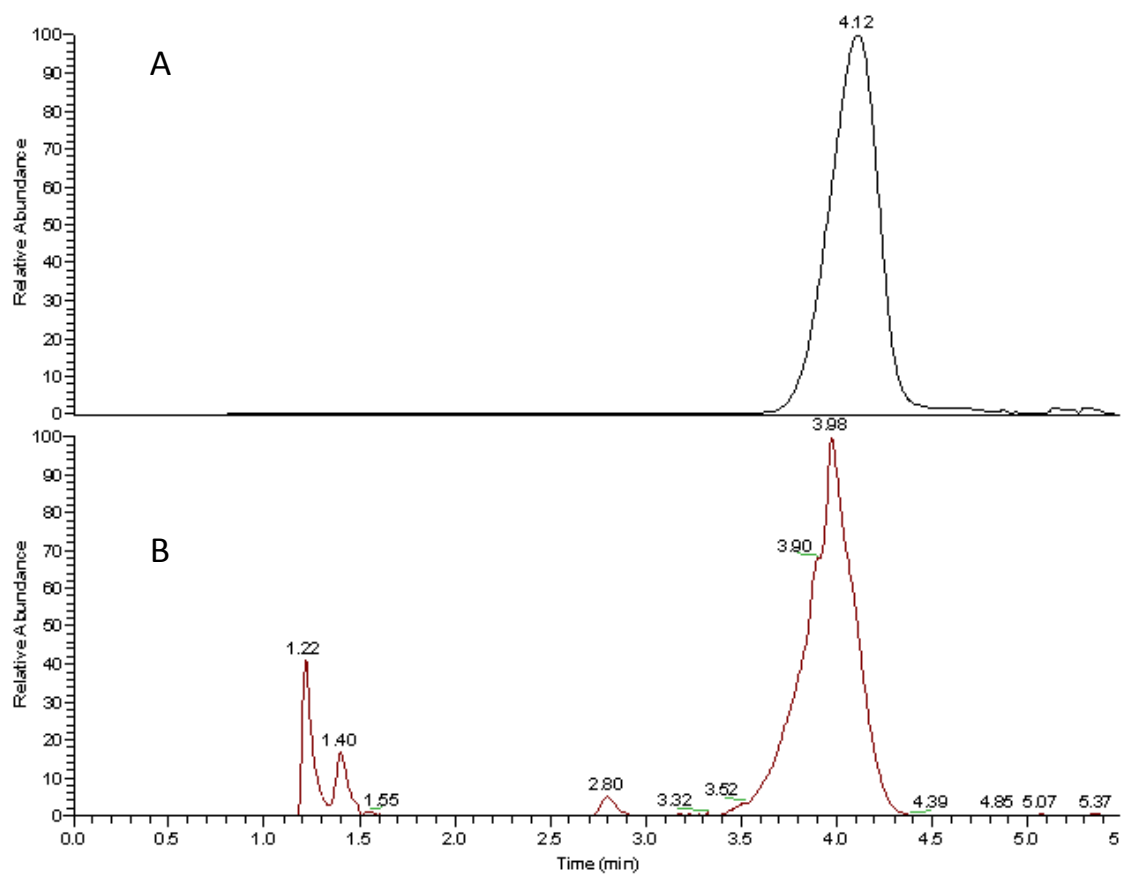


Figure 34 : Chromatogrammes de l'ion à m/z 406,1642 obtenus en LC-MS à partir du Pgsh3SH-Al de synthèse (A) et à partir d'un extrait de moût de Sauvignon blanc (B); colonne analytique : Synchronis C₁₈ Aq, 100 x 2,1mm ; 1,7 μ m (Thermo Scientific)

première (Synchronis C₁₈, 100 x 2,1mm ; 1,7µm, Thermo Scientific). Un signal de même masse exacte et de même temps de rétention est également détecté dans les extraits de moûts. Aussi, il est possible d'envisager que le Pgsh3SH-Al soit présent dans les moûts de Sauvignon blanc.

Avant de poursuivre la caractérisation du Pgsh3SH-Al comme précurseur potentiel du 3SH, nous avons cherché à évaluer sa teneur dans les moûts (Figure 34). Nous observons, d'une part, que l'aire du pic supposé correspondre au Pgsh3SH-Al dans les chromatogrammes des extraits de moût est du même ordre de grandeur que celle du précurseur glutathionylé. Le rapport des aires moyennes du pic du Pgsh3SH et de celui supposé du Pgsh3SH-Al est compris entre 5 et 10. Dans l'hypothèse où la détection et l'ionisation dans la source de ces deux composés en spectrométrie de masse est identique, il est possible d'estimer l'ordre de grandeur des concentrations de ce composé. La teneur du Pgsh3SH-Al dans les moûts de Sauvignon analysés serait comprise entre 10 et 100 µg/L.

Ce composé d'intérêt serait donc présent dans les moûts à des concentrations proches de celles du Pcys3SH (5 à 60 µg/L) et du Pgsh3SH (100 à 600 µg/L), ce qui renforce l'idée que ce composé puisse participer au potentiel en 3SH des moûts.

1.2.2) Recherche du S-3-(hexan-1-al)-glutathion dans les fractions potentiellement précurseur du 3SH

Nous avons, par la suite, voulu déterminer si le Pgsh3SH-Al pouvait correspondre au composé inconnu précurseur du 3SH mis en évidence par chromatographie Flash d'un moût de Sauvignon.

Etant donné qu'il n'existe pas encore de méthode de dosage, le Pgsh3SH-Al est exprimé en équivalent Pgsh3SH. Comme les structures du Pgsh3SH-Al et du Pgsh3SH sont proches, il est fort probable que leur ionisation dans la source et leur détection dans l'analyseur soient également similaires. Les fichiers d'analyse des différentes fractions Flash ont été repris et la masse exacte du Pgsh3SH-Al (m/z 406,1642) a été recherchée à son temps de rétention. Ainsi nous pouvons maintenant localiser le Pgsh3SH-Al au cours du

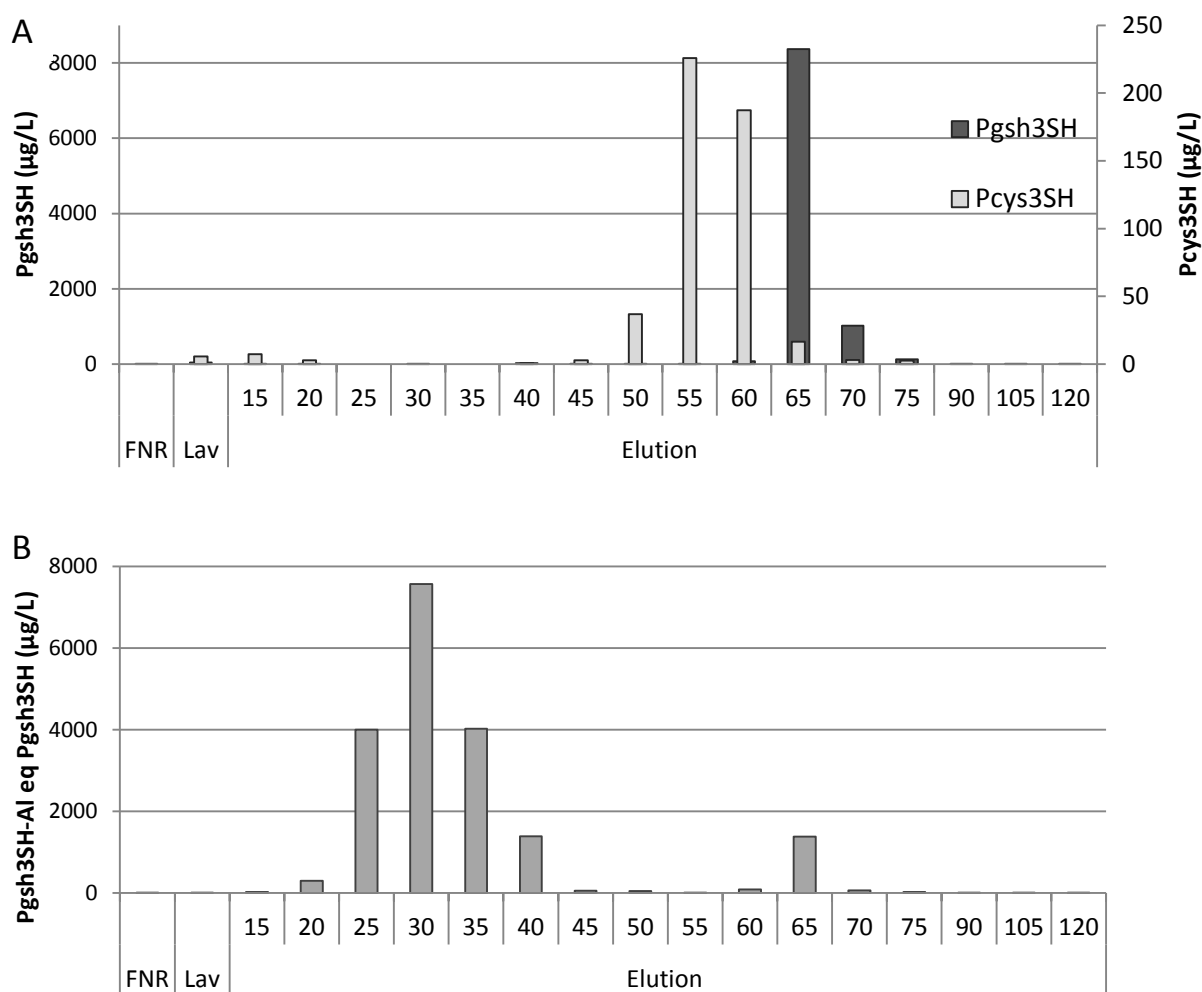


Figure 35 : Analyse des précurseurs cystéinylés (Pcys3SH) et glutathionylés (Pgsh3SH) obtenus en sortie de chromatographie Flash (A), corrélé à la détection du Pgsh3SH-Al exprimé en équivalent Pgsh3SH (B)

Tableau 31 : Teneur en 3SH libéré à partir du Pgsh3SH-Al (500 µg/L) additionné en milieu modèle au cours de la fermentation alcoolique et estimation de son taux de biotransformation en 3SH (%)

3SH (ng/L)	2082 ± 6,9
Taux de biotransformation (%)	0,9 ± 0,5

fractionnement par chromatographie Flash des moûts et également estimer sa concentration.

La détection des *S*-conjugués précurseurs du 3SH dans les fractions obtenues par chromatographie Flash de 5L de moût confirme une nouvelle fois la présence du Pgsh3SH-Al dans les moûts (Figure 35B) et indique qu'il est présent dans les tubes 25 à 40 qui sont dépourvus en Pcys3SH et Pgsh3SH (figure 35A). Ainsi, il sera possible de le séparer des autres composés précurseurs et étudier son impact réel sur la libération du 3SH. La technique de chromatographie Flash est donc également adaptée à la purification partielle du Pgsh3SH-Al.

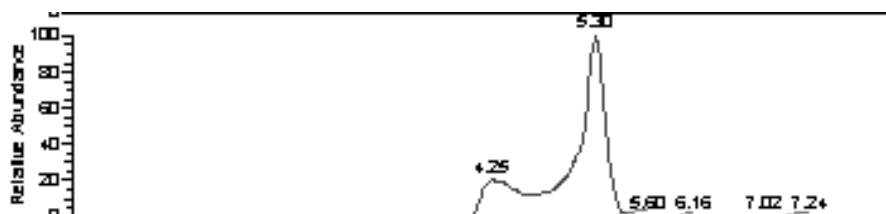
1.3) Validation de son rôle de précurseur du 3SH

Plusieurs informations (masse exacte et analyse du temps de rétention sur 2 colonnes) nous permettent d'envisager que le Pgsh3SH-Al soit présent dans les moûts. Avant de poursuivre dans sa caractérisation, il est nécessaire de vérifier que ce composé soit un précurseur du 3SH. Pour cela, 500 µg/L de Pgsh3SH-Al de synthèse ont été additionnés à du milieu modèle. Cette concentration est choisie arbitrairement puisque les teneurs en ce composé dans les moûts ne sont pas connues ; elles correspondent à environ deux fois la concentration moyenne du Pgsh3SH. La teneur en 3SH libéré après fermentation alcoolique est présentée dans le tableau 31.

Il apparaît qu'une supplémentation du Pgsh3SH-Al de synthèse en milieu modèle conduit à une libération de 3SH de l'ordre de 2000 ng/L. Ainsi, le Pgsh3SH-Al est donc un précurseur du 3SH au même titre que le Pcys3SH et le Pgsh3SH. Son taux de biotransformation en 3SH est de l'ordre de 1 %.

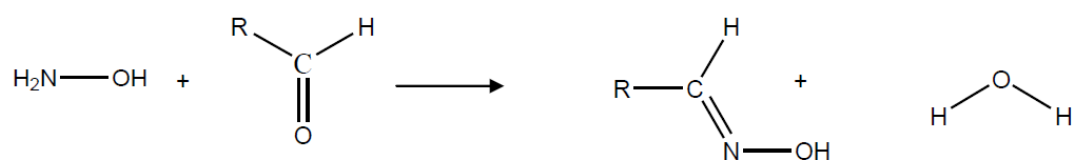
Si les concentrations estimées de ce composé dans les moûts s'avèrent exactes alors la biotransformation du Pgsh3SH-Al en 3SH par les levures conduirait à une libération de 3SH comprise entre 40 et 500 ng/L dans les vins.

(1)



(2)

(A)



(B)

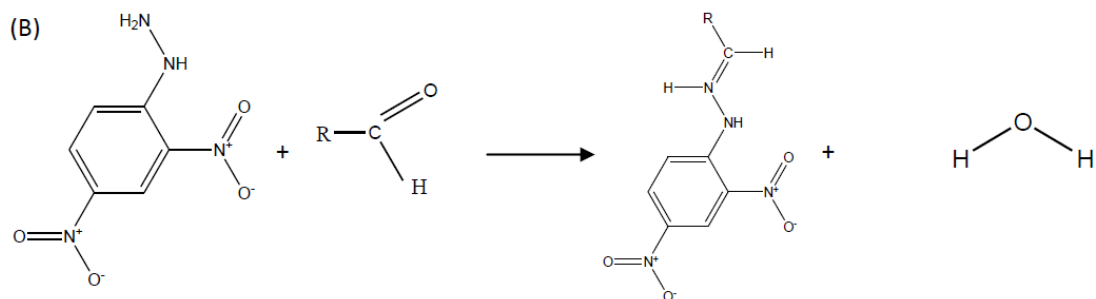


Figure 36 :

(1) Exemple d'un profil chromatographique LC-MS de l'ion m/z à 406 du Pgsh3SH-Al de synthèse,

(2) Dérivation du Pgsh3SH-Al par l'hydroxylamine (A) et par la DNPH (B)

1.4) Mise au point d'une méthode de dosage

Afin d'étudier l'impact réel de ce composé potentiellement précurseur de 3SH, nous avons dans un premier temps développé une méthode de dosage. Une « instabilité analytique » du Pgsh3SH-Al en LC-MS a été observée lors de l'analyse du produit de synthèse. En effet, le composé présente un pic asymétrique qui au cours des analyses successives peut être plus ou moins dédoublé (Figure 36-1). Cette instabilité conduit à une modification de l'aire du pic d'un échantillon à l'autre empêchant ainsi une quantification fiable du composé.

Les paramètres chromatographiques (phase stationnaire ; composition des solvants et gradient d'élution) ont été optimisés en vue de stabiliser le composé au cours de l'analyse. Il est apparu que l'utilisation d'une phase stationnaire de type C₁₈ aQ (phase résistante à l'eau et adaptée à la séparation des composés légèrement polaires) et la présence d'acide formique à 0,1% dans les solvants d'élution (eau et acétonitrile) a permis d'augmenter la résolution chromatographique de la technique pour le Pgsh3SH-Al mais une asymétrie du pic est encore observée (résultats non présentés).

Sachant que le Pgsh3SH-Al est la forme aldéhydique du Pgsh3SH (forme alcool) et que ce dernier présente un profil chromatographique bien résolu et stable, il est alors envisageable que le problème rencontré soit lié à la fonction aldéhyde. Ainsi, la dérivation de celle-ci devrait permettre de stabiliser le composé au cours de l'analyse. Il existe de nombreuses molécules réagissant avec les composés carbonylés tels que les dérivés des amines primaires (hydroxylamine, 2,4-dinitrophénylhydrazine (2,4-DNPH ou réactif de Brady). Ces deux réactifs sont couramment utilisés pour analyser ou extraire sélectivement les dérivés carbonylés d'une matrice complexe aqueuse (Kushnir *et al.*, 2006; Kalhorn *et al.*, 2007; Manini *et al.*, 2010; Kushnir *et al.*, 2011; Toyo'oka, 2012). Ces réactions de dérivation des composés carbonylés sont stables et irréversibles (figure 36-2).

La réaction des fonctions carbonylées et de l'hydroxylamine conduit à la formation d'une oxime, tandis que l'utilisation de la DNPH conduit à la formation d'une hydrazone.

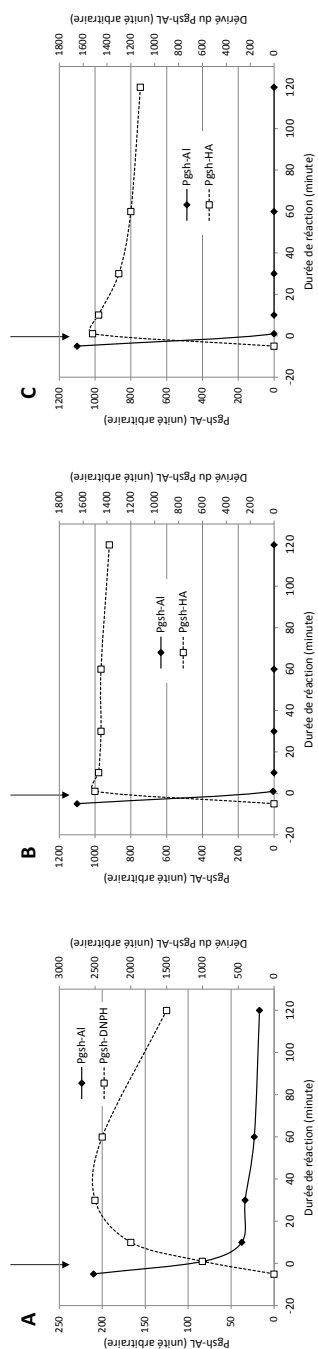


Figure 37: Cinétique de formation des dérivés du Pgsh3SH-Al (Pgsh3SH-DNPH et Pgsh3SH-HA) au cours du temps. La flèche correspond à l'ajout du réactif de dérivation. A : dérivation par la DNPH solubilisée dans l'acétonitrile. B : dérivation par l'HA, à température ambiante. C : dérivation par l'HA, à 60°C (méthanol/eau)

1.4.1) Développement de la méthode de dérivation du S-3-(hexan-1-al)-glutathion

Deux réactifs (Hydroxylamine et DNPH) ont été testés conjointement sur le produit de synthèse. La solution mère de DNPH est préparée selon le protocole décrit par Manini (Manini *et al.*, 2010) à une concentration de 12mM solubilisée dans l'acétonitrile et l'acide formique (98/2). La solution mère de DNPH est considérée stable une semaine à 4°C. La dérivation est réalisée par l'addition de 500 µL d'une solution de DNPH (240 µM) directement dans le vial contenant le Pgsh3SH-Al (1,2 nmol). La réaction a lieu à température ambiante et à l'obscurité. La dérivation par l'hydroxylamine est réalisée selon le protocole décrit par Kalhorn *et al.* (Kalhorn *et al.*, 2007). Brièvement, 100µL d'une solution d'hydroxylamine (6,98 mg/mL, méthanol/eau ; 50/50) sont additionnés au Pgsh3SH-Al. La réaction est réalisée soit à température ambiante soit à 60 °C après agitation (vortex/ultrason) et suivie durant 4 heures. La réaction est arrêtée par l'addition de 400 µL d'une solution aqueuse de méthanol (50/50).

Le Pgsh3SH-Al et ses dérivés (Pgsh3SH-DNPH et Pgsh3SH-HA) sont suivis au cours de la réaction (Figure 37). Concernant l'utilisation de la DNPH, le pic du Pgsh3SH-Al (m/z 406,1642) n'est quasiment plus détecté après 10 minutes de réaction à l'obscurité au profit de son dérivé de m/z 586,1926 (Pgsh3SH-DNPH, Figure 37A). Il semblerait que la réaction ne soit jamais totale et que l'intensité du pic du Pgsh3SH-DNPH tende à diminuer au cours du temps. Parallèlement, il apparaît que la réaction de l'hydroxylamine est totale et quasi instantanée après son addition sur le Pgsh3SH-Al et ce, quelle soit la température considérée (température ambiante ou 60°C, Figure 37 B et C). En revanche il semblerait que le chauffage à 60°C induise une légère dégradation du dérivé du Pgsh3SH-Al (Pgsh3SH-HA) au cours du temps. Enfin, la comparaison de l'intensité relative des pics indique que la détection du dérivé Pgsh3SH-DNPH est supérieure à celle du Pgsh3SH-HA. Ceci doit s'expliquer par une meilleure ionisation du composé dans la source. D'un point de vue pratique, la solution stock d'hydroxylamine étant stable plusieurs mois (Kalhorn *et al.*, 2007) et le fait que la réaction soit totale avec ce dérivé d'amine primaire nous a conduit à fixer les conditions de dérivation suivantes ; l'hydroxylamine sera utilisée comme réactif de dérivation et la réaction est conduite à température ambiante pendant 15 minutes.

Tableau 32 : Influence de la quantité d'HA utilisé sur rendement de dérivation du Pgsh3SH-Al

Hydroxylamine ($\mu\text{mol}/\text{vial}$)	Pgsh3SH-Al (<i>unité arbitraire</i>)	Pgsh3SH-HA (<i>unité arbitraire</i>)
0	1118	0
0,34	645	580
1,7	40	1635
8,5	20	1610
17	6	1770
8,4	12	1735
420	20	1685

Tableau 33 : Estimation du rendement d'extraction du Pgsh3SH-Al (exprimé en unité arbitraire) lors de la purification à partir de 1 mL de moût

Addition Pgsh3SH-Al (1,2 nmol)	Dérivé du Pgsh3SH-Al (<i>unité arbitraire</i>)		
	Répétition	moyenne	ecartype
Avant pré-purification	1130	1077	86
	978		
	1124		
Avant quantification	1283	1308	30
	1300		
	1341		

Par la suite, nous avons cherché à déterminer la concentration nécessaire et suffisante en hydroxylamine (Tableau 32). Un excès de réactif conduit à une contamination de la colonne qui induit une dérivation "on-column" non désirée des échantillons suivants (résultats non présentés). Ces essais ont été complétés en matrice complexe afin de vérifier qu'il n'existait pas d'artefact dû à des composés présents dans l'extrait. Dans un premier temps, le Pgsh3SH-Al de synthèse (1,2 nmol) a été ajouté à un extrait de moût, repris dans le méthanol, afin d'affiner la concentration nécessaire en hydroxylamine. Les résultats présentés dans le tableau 5 ont été obtenus après 15 minutes d'incubation à température ambiante. L'utilisation de 1,7 μ mol d'hydroxylamine par échantillon est suffisante pour une dérivation totale en matrice complexe.

1.4.2) Pré-purification du S-3-(hexan-1-al)-glutathion des moûts

Une fois les paramètres de dérivation fixés, nous nous sommes intéressés aux étapes de purification partielle des S-conjugués du moût en vue de leur quantification (cf. Matériels et méthodes). Nous avons vu précédemment que la méthode initialement utilisée pour pré-purifier les précurseurs glutathionylés et cystéinylés permettait également l'extraction du Pgsh3SH-Al. Nous avons donc appliqué ce même protocole utilisant la SPE en phase inverse (Cartouche SPE-C₁₈, Supelco) et déterminé les rendements d'extraction du Pgsh3SH-Al. Pour cela, 1,2 nmol du produit de synthèse a été additionné soit directement dans le moût avant pré-purification (1 mL) soit dans un extrait correspondant à 1 mL de moût, c'est à dire avant quantification. Les teneurs en Pgsh3SH-Al retrouvées en fin d'analyse sont présentés dans le Tableau 33.

Il apparait que la purification du Pgsh3SH-Al par cette méthode est optimale avec un rendement supérieur à 80 % d'extraction du composé présent dans le moût. Ainsi la méthode initiale de dosage des précurseurs ne nécessite pas d'optimisation particulière pour la quantification du Pgsh3SH-Al.

Tableau 34 : Impact de la dérivation sur le dosage du Pcys3SH, du Pgsh3SH et du Pgsh3SH-Al. La moyenne et l'écart-type des 5 répétitions sont également indiqués (n=5)

Quantité détectée (exprimé en rapport des aires à l'étalon interne)								
	Pcys3SH			Pgsh3SH			Pgsh3SH-Al	
Sans dérivation	0,44			3,05			-	
(méthode initiale)	0,38			3,10			-	
	0,41	0,40	± 0,03	2,80	2,99	± 0,12	-	-
	0,43			2,95			-	
	0,37			3,05			-	
Dérivatisation	0,46			3,29			1,25	
(Hydroxylamine, 1,7 μ mol)	0,48			3,06			1,10	
	0,53	0,50	± 0,05	3,02	3,22	± 0,16	1,32	1,29 ± 0,14
	0,58			3,39			1,29	
	0,48			3,33			1,50	

1.4.3) Impact de la dérivation sur le dosage de l'ensemble des formes précurseurs du 3SH

Afin d'obtenir une méthode unique permettant le dosage de l'ensemble des formes précurseurs (Pcys3SH, Pgsh3SH et Pgsh3SH-Al), il était, dans un premier temps, nécessaire de vérifier que la dérivation du Pgsh3SH-Al n'induit pas d'artéfact dans le dosage du Pgsh3SH et du Pcys3SH. Par ailleurs, dans la méthode classique, l'extrait sec de moût (obtenu après purification sur SPE et évaporation) est repris dans une solution aqueuse d'acide formique (0,1%), alors que l'étape de dérivation est réalisée en solution de méthanol à 50%. Nous avons également étudié l'impact de l'acide formique sur la dérivation. Celle-ci a été conduite sur produit de synthèse et sur extrait de moût solubilisé dans l'acide formique 0,1% ou en méthanol 50 %. Aucune différence n'a été observée dans la détection des dérivés du Pgsh3SH-Al (résultats non présentés). Le développement et la validation de la méthode est donc poursuivi en reprenant l'extrait dans l'acide formique à 0,1%.

Par la suite, 10 extractions d'un même moût sont réalisées. L'étalon interne (Pgsh3SHD3) est additionné au moût avant extraction. La moitié des extraits ainsi obtenus sont dérivés en présence d'hydroxylamine avant l'analyse en LC-MS. Les 5 extraits restants sont analysés par la méthode classique. L'ensemble des résultats sont exprimés en rapport de l'aire du pic d'intérêt sur celle du pic de l'étalon interne (Tableau 34).

Quels que soient les composés et la méthode considérée, le coefficient de variation de la méthode de dosage est systématiquement inférieur à 11 %. Ainsi, nous pouvons en conclure que, d'une part, l'utilisation de l'hydroxylamine sur l'extrait de moût n'induit pas de modification significative dans le dosage du Pcys3SH et du Pgsh3SH et, d'autre part, que la répétabilité d'extraction et de quantification du Pgsh3SH-Al est visiblement satisfaisante.

1.4.4) Validation de la méthode de dosage du S-3-(hexan-1-al)-glutathion dans les moûts

Le domaine de validité de la méthode est étudié en termes de linéarité, de répétabilité et limite de quantification, de justesse et de fidélité.

Tableau 35 : Récapitulatif des validations de la méthode de dosage du S-3-(hexan-1-al)-glutathion et des autres composés précurseurs

Composé	CV	Equation	R ²	Domaine de linéarité (µg/L)	Limite de quantification (µg/l)	Gamme de validation (µg/L)
Pcys3SH	4,36	Y=0,0269x	0,992	0-800	1,2	1,2-800
Pgsh3SH	1,7	Y=0,0428x	0,995	0-800	2,6	2,6-800
Pgsh3SH-Al	7	Y=0,0303x	0,997	0-800	5,2	5,2-800

1.4.4.1) Linéarité et courbe standard

Afin de doser conjointement le Pgsh3SH-Al, le Pgsh3SH et le Pcys3SH, des gammes étalons ont été préparées en supplémentant 1 mL de moût en concentrations croissantes de chaque composé, allant de 1 à 800 µg/L. Pour chaque concentration, les précurseurs sont extraits et dérivés selon la méthode précédemment décrite. Le moût utilisé est un moût de Sauvignon blanc de Bordeaux du millésime 2013. Ces trois composés sont dosés par LC-MS et la séparation chromatographique est réalisée sur une colonne de type C₁₈ aQ (1,7µm ThermoFisher, France) initialement utilisée pour le dosage des formes précurseurs connues. Les temps de rétention sur cette colonne étant légèrement différents de ceux obtenus sur la colonne Synchronis C₁₈ (1,7µm, ThermoFisher) jusqu'ici utilisée, le dérivé du Pgsh3SH-Al est injecté préalablement pur. Les conditions chromatographiques sont décrites dans le chapitre matériels et méthodes.

La courbe standard est construite pour chaque composé sur la base d'une corrélation linéaire entre l'aire des pics considérés par rapport à l'aire de l'étalon interne et les concentrations mentionnées précédemment. L'ensemble des résultats est présenté dans le Tableau 35. Pour les trois composés, le coefficient de détermination R² est supérieur à 0,99. L'hypothèse de linéarité de réponse est donc validée pour les 3 composés précurseurs.

1.4.4.2) Répétabilité , limite de quantification

La répétabilité se définit comme l'expression quantitative de la précision quand l'opérateur applique la technique sur le même échantillon, dans le même laboratoire, avec les mêmes appareils et les mêmes réactifs, le même jour. La justesse est déterminée à partir d'une série de cinq extractions, suite à des ajouts-dosés. Le coefficient de variation du dosage des trois composés est indiqué dans le Tableau 34. Il est défini comme le rapport entre l'écart-type et la moyenne. Le coefficient de variation (CV) n'excède pas les 7 %, ce qui est satisfaisant. Le Tableau 35 précise également les limites de quantification, elles correspondent à la concentration minimale qui génère un signal dix fois supérieur au signal du bruit de fond. L'ensemble de ces résultats valide donc la méthode de quantification des précurseurs du 3SH dans les moûts.

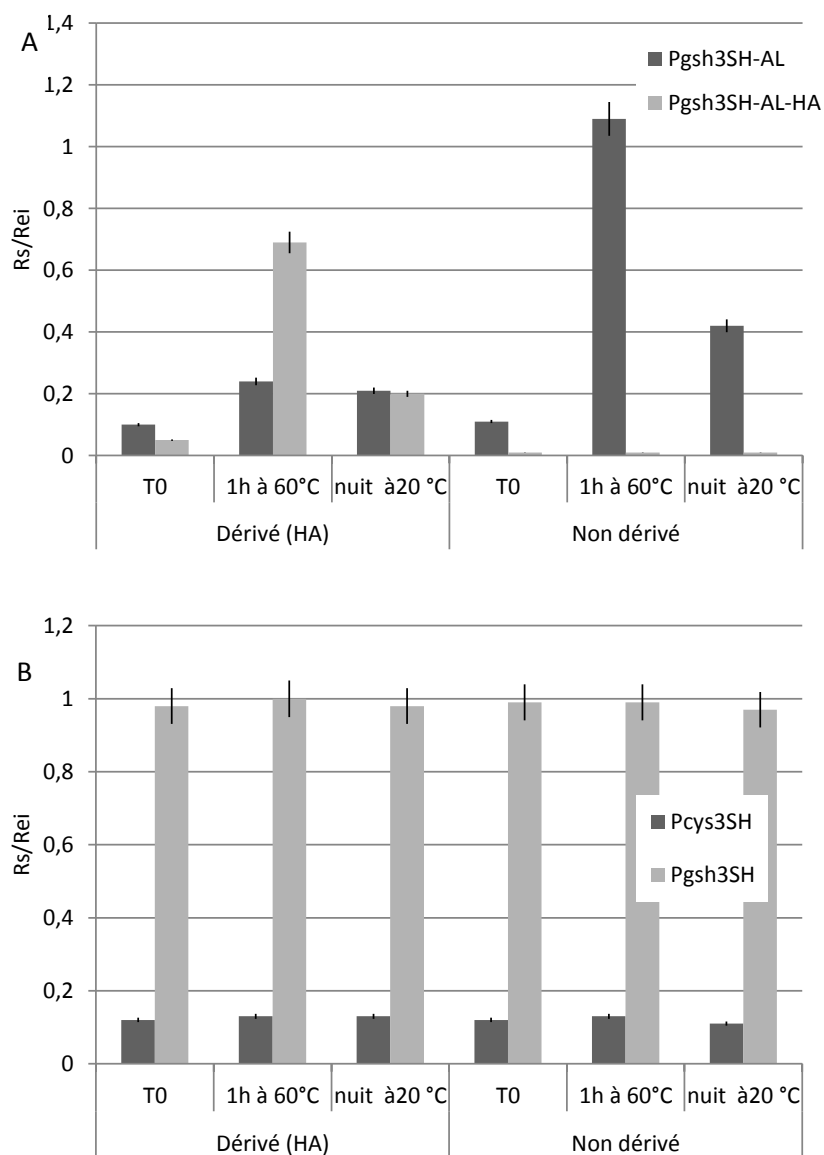


Figure 38 : Dosage des formes Pgsh3SH-Al et Pgsh3SH-Al-HA (A) ainsi que des formes Pcys3SH et Pgsh3SH (B) selon si l'échantillon est dérivé ou non et selon la température et la durée de conservation de l'échantillon avant injection (n=2)

1.4.4.3) Stabilité des échantillons avant analyse

La stabilité des échantillons après extraction a également été étudiée afin de savoir s'il était possible de stocker les échantillons extraits avant leur analyse en LC-MS. Il est apparu que le produit de synthèse dérivé en présence d'hydroxylamine est stable jusqu'à 7 jours à 10 °C (température du passeur d'échantillon) et jusqu'à plus d'un mois au congélateur (résultats non présentés). En revanche, lors de l'analyse de moût, nous avons suspecté un artéfact dans la méthode de dosage ici développée. En effet, il semblerait que le dérivé du Pgsh3SH-Al tende à croître au cours de la série d'analyse. Nous avons cherché à comprendre les mécanismes sous-jacents impliqués dans ce phénomène. Afin d'évaluer l'impact de l'hydroxylamine et de la température, un même moût est extrait 12 fois en parallèle et les extraits ainsi obtenus sont soit analysés directement après purification (T0) soit laissés à température ambiante pendant une nuit ou encore incubés une heure à 60 °C. Pour chaque condition, une modalité sans hydroxylamine est préparée (Figure 38).

A T0 en présence d'hydroxylamine, il apparaît que la réaction de dérivation de la fonction aldéhyde n'est pas totale puisque les deux formes sont encore présentes (Figure 38A). Après une heure à 60°C, la teneur en forme dérivée (Pgsh3SH-Al-HA) est augmentée d'un facteur supérieur à 10 et d'un facteur 4 après une nuit à température ambiante. Quelle que soit la modalité considérée la forme non dérivée est toujours présente et est systématiquement supérieure à la modalité injectée immédiatement (T0). En absence d'hydroxylamine (non dérivé, Figure 38A), une tendance similaire est observée (facteur 10). En revanche, l'intensité des pics du Pcys3SH et Pgsh3SH reste stable quelles que soient les modalités considérées (Figure 38B). Ainsi, une synthèse ou une libération de Pgsh3SH-Al a lieu très rapidement dans l'extrait de moût à 60 °C indépendamment de la présence d'hydroxylamine.

Afin d'évaluer l'impact de la température et d'avancer dans la compréhension de ce phénomène, une cinétique est réalisée sur 3 heures à 60°C à partir d'un extrait de moût supplémenté ou non en précurseurs du 3SH (Pcys3SH, Pgsh3SH et Pgsh3SH-Al ; 200µg/L).

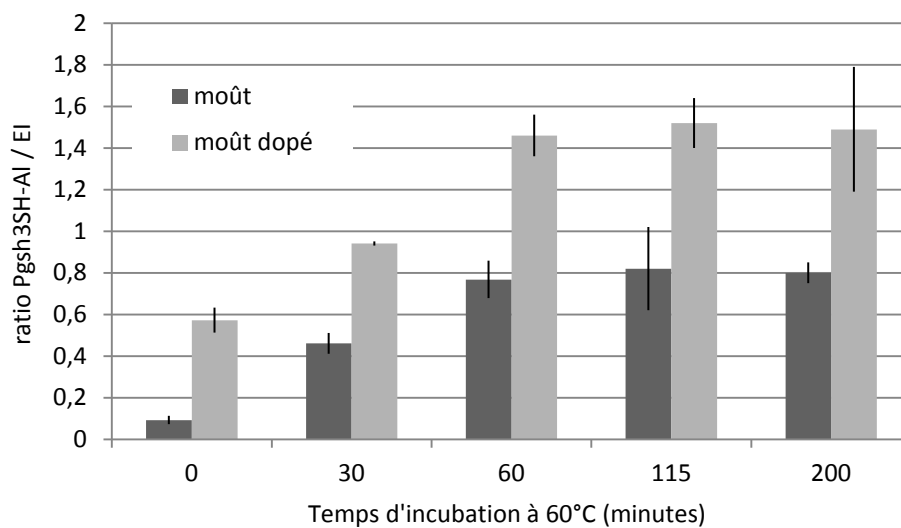


Figure 39: Teneur en Pgsh3SH-Al (exprimée par le ratio des aires du pic du Pgsh3SH-Al sur celui de l'étalon interne, EI) dans un extrait de moût dopé ou non, conservé 3 heures à 60°C

Les résultats présentés dans la Figure 39 confirment la libération précédemment observée de Pgsh3SH-Al lorsque l'extrait est chauffé à 60°C. Un palier est observé après une heure. Le facteur d'augmentation entre la modalité témoin (injecté immédiatement) et les modalités chauffées est de l'ordre de 10 dans les extraits de moût alors qu'il est plus faible dans les échantillons issus d'un moût dopé (de l'ordre de 3). Ainsi, nous pouvons en conclure qu'il s'agit bien d'une synthèse de Pgsh3SH-Al à partir des composés de l'extrait de moût et non d'une simple augmentation de la détection du pic. Comme précédemment aucun effet n'est observé sur les autres formes de précurseurs du 3SH (Pcys3SH et Pgsh3SH, résultats non présentés).

Ainsi, nous pouvons en conclure qu'il existe dans le moût un composé extrait dans les mêmes conditions que les précurseurs connus du 3SH qui, à chaud, peut libérer du Pgsh3SH-Al. L'explication et l'identification du composé à l'origine de ce phénomène est menée dans le sous-chapitre suivant.

1.5) Discussion

Le travail mené jusqu'ici nous a permis d'identifier une nouvelle forme précurseur du 3SH : le S-3-(hexan-1-al)-glutathion (ou Pgsh3SH-Al). Sa teneur estimée dans les moûts est de l'ordre de quelques dizaines à une centaine de µg/L et son taux de biotransformation en 3SH est de l'ordre de 1%.

Ce composé étant instable lors de son analyse par LC-MS, nous avons mis au point une méthode de dosage compatible avec les formes précurseurs cystéinyliées et glutathionyliées permettant ainsi l'analyse de l'ensemble des formes précurseurs (Pcys3SH, Pgsh3SH et Pgsh3SH-Al).

Enfin, une instabilité dans la conservation des extraits a été mise en évidence et rend obligatoire l'analyse des échantillons dans l'heure. L'origine de cette instabilité est étudiée dans le sous-chapitre suivant. Afin de finaliser l'étude de ce composé, il nous reste encore à déterminer son taux de participation à la libération du 3SH et à vérifier s'il existe bien une

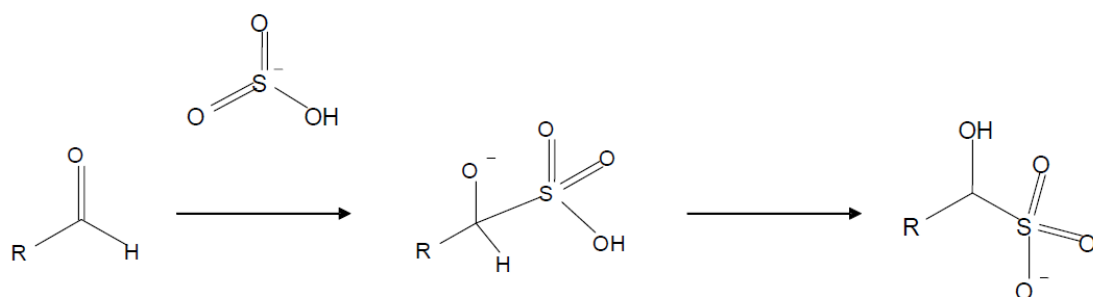
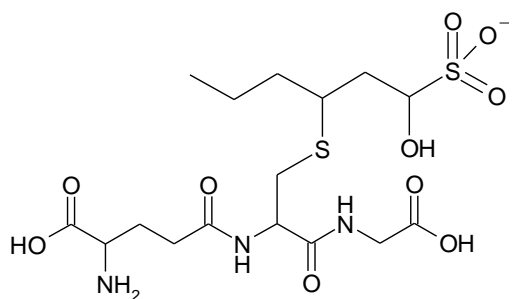


Schéma 4: Mécanisme de réduction des aldéhydes en acides α -hydroxysulfoniques



$C_{16}H_{29}N_3O_{10}S_2$ PM : 487,129441

Schéma 5 : Formule semi-développée de l'acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique (Pgsh3SH-SO₃)

Tableau 36 : Rendement de la réaction d'addition du SO₂ sur le S-3-(hexan-1-al)-glutathion

SO ₂ (équiv.)	Temps de réaction (h)	Pgsh3SH-Al / Pgsh3SH-SO ₃
2	2	90/10
2	24	85/15
10	1	20/80
10	2	1/99
10	24	1/99

corrélation entre la teneur en ces trois formes précurseurs dans les moûts et celles en 3SH libéré dans les vins correspondants.

2) Etude de la contribution au potentiel en 3SH de l'acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique

Nous avons vu précédemment qu'en condition acide et à chaud (acide formique 0,1%, 60°C) du S-3-(hexan-1-al)-glutathion était libéré dans les extraits pré-purifiés de moût. Le facteur d'augmentation étant de l'ordre de 10, nous avons émis l'hypothèse qu'il devait exister dans les moûts un ou plusieurs composés en concentration relativement importante à l'origine de cette synthèse. La production de Pgsh3SH-Al dans les extraits n'est peut être due qu'à un artefact chimique, mais la possibilité que l'extrait renferme également un autre composé précurseur d'arôme nous a poussé à poursuivre dans sa caractérisation.

Les aldéhydes sont des dérivés carbonylés qui peuvent réagir avec les ions bisulfite HSO_3^- particulièrement présents dans les moûts selon le mécanisme décrit dans le schéma 4.

Les bisulfites sont utilisés abondamment (de 5 à 400 mg/L) pour la stabilisation microbiologique et chimique des moûts et des vins (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998-2004). Selon le pH, la température et la teneur en alcool, un équilibre se crée entre les formes libres du dioxyde de soufre (SO_2 et HSO_3^-) et les formes combinées. Ces réactions ont très été étudiées en œnologie et en particulier dans les vins liquoreux (Barbe *et al.*, 2000), qui ont un fort pouvoir combinant. Après formation de l'acide α -hydroxysulfonique, l'aldéhyde peut être régénéré par décomposition de la combinaison bisulfite par une base ou un acide dilué.

Dans cette partie, nous avons envisagé l'hypothèse que le Pgsh3SH-Al soit formé au cours de la conservation ou du chauffage des extraits de moût par ce même mécanisme, c'est-à-dire en décomposant la combinaison bisulfite de son acide α -hydroxysulfonique correspondant. La formule semi-développée de ce composé est présentée dans le Schéma 5 et la masse théorique de l'ion pseudo-moléculaire associé $[\text{M}+\text{H}]^+$ est $m/z = 488,1367$.

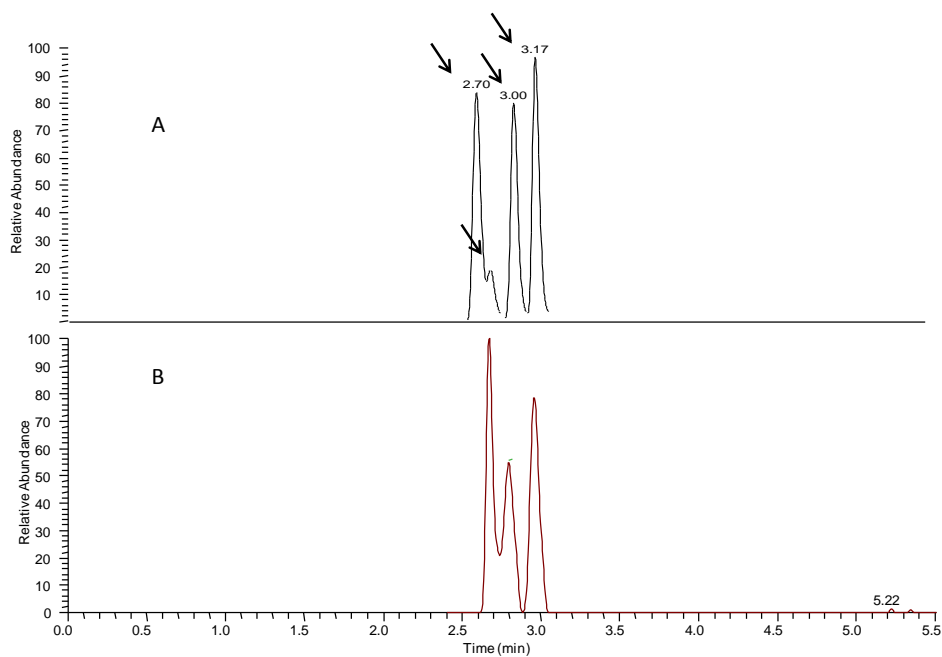


Figure 40 : Chromatogramme de l'ion à m/z 488 obtenus en LC-MS (méthode chromatographique) du Pgsh3SH-SO₃ de synthèse (A) et du Pgsh3SH-SO₃ dans un extrait de moût (B)

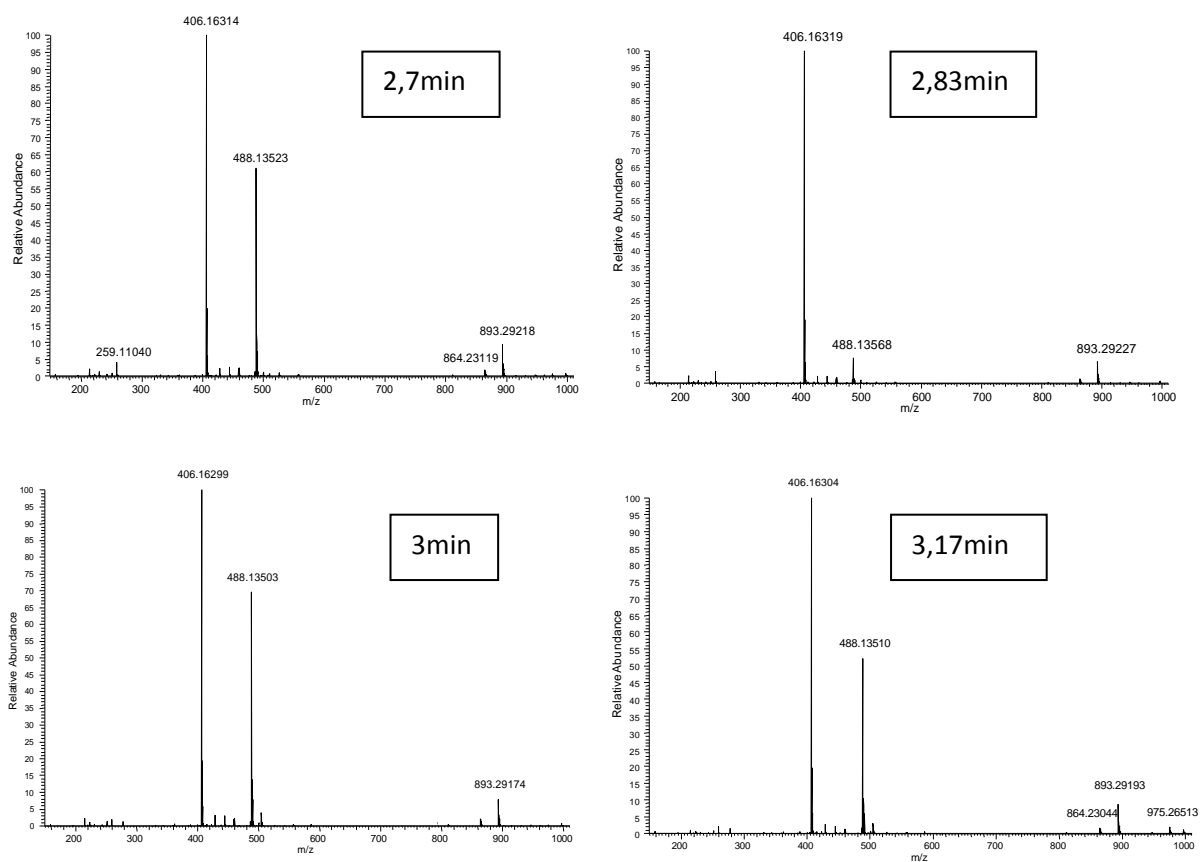


Figure 41 : Spectre de masse en mode positif des 4 pics (2,7min, 2,83min, 3min et 3,17min) du Pgsh3SH-SO₃ de synthèse

2.1) Synthèse de l'acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique

Les combinaisons bisulfiteques sont généralement obtenues par une réaction d'addition nucléophile de l'ion hydrogénosulfite (généralement apporté par l'hydrogénosulfite de sodium; NaHSO_3) sur le dérivé carbonyle. Cette réaction est couramment utilisée pour purifier les composés carbonylés d'un mélange.

Dans notre cas, la synthèse de l'acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique (Pgsh3SH-SO_3) est obtenue par l'addition de SO_2 sur le S-3-(hexan-1-al)-glutathion précédemment synthétisé (Pgsh3SH-Al). Le rendement de la réaction a été déterminé en fonction de la dose de SO_2 utilisée et du temps de réaction (Tableau 36).

L'addition de SO_2 à 10 équivalents de Pgsh3SH-Al conduit à une réaction totale après deux heures d'incubation à température ambiante. Ce résultat conforte l'hypothèse d'une combinaison bisulfiteque du SO_2 sur le Pgsh3SH-Al dans les moûts.

2.2) Caractérisation de l'acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique en LC-MS

Le chromatogramme obtenu par l'analyse du produit de synthèse indique que le Pgsh3SH-SO_3 est élué en quatre pics distincts (Figure 40A). Ce profil chromatographique confirme la présence de 3 centres chiraux dans la molécule (une configuration fixe dans la partie glutathionylée du composé, le carbone en position 3 et en position 1). Il existe donc 4 diastéréoisomères du Pgsh3SH-SO_3 .

L'interprétation des spectres de masses en mode positif permet de confirmer que la molécule possède une masse unitaire de 487 g/L par la présence de l'ion pseudo-moléculaire monochargé à m/z 488 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) (Figure 41). L'ion à m/z 406 est vraisemblablement issu d'une fragmentation dans la source de la combinaison bisulfiteque ($[\text{F}+\text{H}]^+$). L'ion dimère $[\text{2M}+\text{H}]^+$ est également présent à m/z 893 tandis que l'ion à m/z 864 peut être attribué au dimère $[\text{M}+\text{F}+\text{H}]^+$. La mesure de la masse exacte permet de confirmer que le composé a pour formule brute $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{S}_2$, il s'agit donc bien du Pgsh3SH-SO_3 . Il est intéressant de noter que selon le stéréoisomère considéré, la fragmentation dans la source est plus ou moins

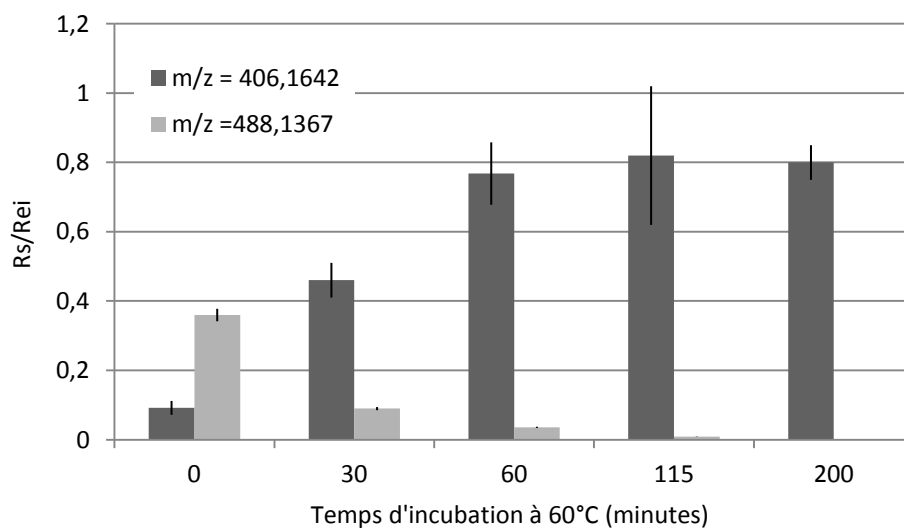


Figure 42 : Estimation de l'abondance du signal de l'ion à m/z 488 associé à la présence du Pgsh3SH-Al sous forme bisulfite (exprimée par le ratio des aires du pic d'intérêt sur celui de l'étalon interne, EI) lors de l'incubation des extraits de moûts à 60°C. Le même échantillon est donc réinjecté à 30, 60, 115, et 200 minutes

marquée. En effet, le pic à 2,83 minutes est représenté quasiment exclusivement par l'ion à m/z 406. Ainsi, la quantification future de ce composé devra être réalisée en sommant le signal de ces 2 ions monochargés. De la même manière que pour l'étude du Pgsh3SH-Al, nous avons recherché le Pgsh3SH-SO₃ dans les extraits de moût par comparaison du temps de rétention et du spectre de masse du produit de synthèse (Figure 40B). La comparaison des temps de rétention et du spectre de masse corrobore donc l'hypothèse de la présence du Pgsh3SH-SO₃ dans le moût.

2.3) Confirmation de l'existence de l'acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique dans les moûts

L'hypothèse de l'existence d'un bisulfite du Pgsh3SH-Al nous conduit donc à proposer une nouvelle forme potentiellement précurseur du 3SH ; l'acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique (Pgsh3SH-SO₃). Ce composé pourrait être à l'origine de la synthèse de Pgsh3SH-Al observé précédemment lors du chauffage de l'extrait en condition légèrement acide.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons recherché dans les échantillons précédemment analysés au cours de l'incubation à 60°C de l'extrait, le Pgsh3SH-SO₃ par sa masse exacte et son temps de rétention. Les résultats sont compilés dans la Figure 42. Un pic à m/z de 488,1367 est détecté dans les échantillons. Il apparaît clairement que ce pic est majoritaire dans les échantillons avant chauffage et que sa teneur chute au cours du temps de manière proportionnelle à l'augmentation de la quantité de Pgsh3SH-Al. Ces observations corroborent donc l'hypothèse de la présence, dans le moût, d'une forme bisulfitique du Pgsh3SH-Al.

Ainsi, la méthode de dosage du Pgsh3SH-Al induit une décomposition de la combinaison bisulfitique et donc une possible surestimation de la teneur en forme libre. Ceci résultant très probablement du fait que la combinaison est peu stable ; lorsque la dose de SO₂ libre ou la composition du milieu est modifiée, la dissociation de cette combinaison, nécessaire au rétablissement des équilibres, va régénérer la forme libre du Pgsh3SH-Al. La pré-purification des S-conjugués à partir du moût induit inéluctablement une modification drastique de la composition de la matrice. De plus, la présence d'acide dans l'extrait final ou

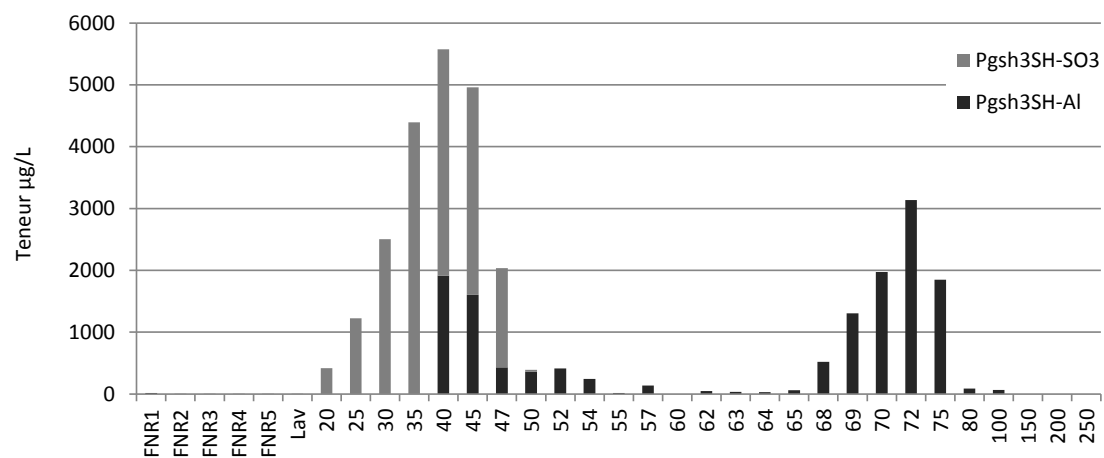


Figure 43 : Dosages des Pgsh3SH-Al et Pgsh3SH-SO₃ dans les fractions obtenues par chromatographie Flash

d'hydroxylamine semble également favoriser cette décombinaison. A l'heure actuelle, nous n'avons pas trouvé de solution permettant la stabilisation des deux formes autre qu'une analyse immédiate de l'extrait après son obtention.

2.4) Identification et quantification de l'acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique dans les fractions obtenues par chromatographie Flash.

Comme précédemment, nous avons recherché le signal du Pgsh3SH-SO₃ dans les fractions que nous avons obtenu lors de la purification partielle des S-conjugués du moût par chromatographie Flash. Les formes libres et combinées du Pgsh3SH-Al sont exprimées en équivalent Pgsh3SH (µg/L) (Figure 43).

Il apparaît que le bisulfite du Pgsh3SH est présent dans les premières fractions d'élution couvrant les tubes 20 à 52. La combinaison bisulfitique des composés carbonylés généralement peu solubles conduit à la formation de l'acide α-hydroxysulfonique soluble. Ainsi le Pgsh3SH-SO₃, plus polaire, est désorbé de la phase par un plus faible pourcentage de méthanol dans le solvant d'élution que la forme aldéhydique libre.

La présence concomitante du Pgsh3SH-Al avec le Pgsh3SH-SO₃ dans les premières fractions d'élution pourrait être attribuée à une décomposition de la combinaison bisulfitique post-élution dans les fractions. En effet, il est difficilement envisageable qu'un même composé (Pgsh3SH-Al) présente deux temps de rétention aussi éloignés.

Ainsi, si l'on considère que la somme des deux composés dans les fractions couvrant les tubes 20 à 52 correspond au Pgsh3SH-SO₃ initialement présent dans le moût, il apparaît que sa teneur dans moûts pourrait être du même ordre de grandeur que le Pgsh3SH-Al. Sa contribution au potentiel en 3SH est donc envisageable. Cependant, l'assimilation de ce composé par les levures reste à confirmer.

Tableau 37 : Teneur en 3SH libéré à partir du Pgsh3SH-SO₃ (1mM) additionné en milieu modèle au cours de la fermentation alcoolique et estimation de son taux de biotransformation en 3SH (%)

3SH libéré (ng/L)	495 ± 96
Taux de biotransformation (%)	0,36 ± 0,18

Tableau 38 : Concentrations en précurseurs cystéinylés (Pcys3SH), glutathionylés (Pgsh3SH) et glutathionylés sous forme aldéhydique libre ou combinée (Pgsh3SH-Al total) dans les moûts de Bordeaux et Sancerre des millésimes 2011 à 2013. (n) correspond au nombre d'échantillons analysé

Millésime	Origine	Concentration des précurseurs de 3SH (µg/L)		
		Pcys3SH	Pgsh3SH	Pgsh3SH-Al (total)
2011	Bordeaux (n=20)	15-60	180-600	15-300
	Sancerre (n=10)	35-100	180-350	5-100
2012	Bordeaux (n=15)	30-110	250-550	5-120
	Sancerre (n=10)	60-100	300-500	10-80
2013	Bordeaux (n=5)	25-65	250-350	35-280
	Sancerre (n=10)	15-100	140-280	10-160

2.5) Validation de son rôle de précurseur du 3SH

Afin de vérifier si le Pgsh3SH-SO₃ peut également participer à la libération des thiols volatils au même titre que le Pgsh3SH-Al, 1μM (487μg/L) a été additionné à du milieu modèle et fermenté. Avant ensemencement, la teneur relative en forme bisulfite et aldéhydique a été déterminée. Moins de 20% du Pgsh3SH-Al total est sous forme libre (Tableau 37) ainsi il semblerait qu'une décomposition partielle de la combinaison aldéhydique du Pgsh3SH-SO₃ ait eu lieu dans le milieu de fermentation. En fin fermentation, 495 ng/L de 3SH est retrouvé indiquant que le Pgsh3SH-SO₃ peut être à l'origine d'une partie des thiols volatils libérés dans les vins. Son taux de biotransformation est estimé à 0,36 %. Sa contribution à la libération du 3SH est donc plus modérée.

Les 20% de forme libre présentes avant ensemencement semblent indiquer une décomposition rapide du bisulfite dans le milieu, confirmant que la combinaison bisulfite est facilement réversible en milieu modèle. Avant de conclure définitivement sur le rôle du Pgsh3SH-SO₃ nous devons vérifier d'une part l'influence de la dose de SO₂ utilisée et, d'autre part, suivre au cours de la phase stationnaire le ratio des formes aldéhydiques et bisulfitiques. Ces pistes seront développées dans le chapitre 8 de la partie 2.

En conclusion, une nouvelle forme précurseur de 3SH a été mise en évidence, toutefois celle-ci est en équilibre avec le Pgsh3SH-Al. Cet équilibre pourrait être dépendant de la concentration en SO₂ du milieu, il est à l'heure actuelle difficile de définir le rôle exact de ces deux composés.

III. Applications : Dosage du Pgsh3SH-Al dans les moûts

Cette étude a pour but d'estimer les teneurs moyennes des différents S-conjugués dans les moûts, d'évaluer comparativement les teneurs en Pgsh3SH-Al à celles des formes déjà connues. Dans cette étude descriptive, nous avons évalué la teneur globale en Pgsh3SH-Al (forme libre et combinée). Les moûts sont issus des appellations Bordeaux et Sancerre, sur trois millésimes (Tableau 38).

Les résultats des dosages obtenus indiquent que les teneurs en précurseurs sont variables selon l'appellation. Les Pcys3SH sont présents, à Bordeaux, à des teneurs inférieures à celles retrouvées à Sancerre. A l'inverse, les teneurs en Pgsh3SH et en Pgsh3SH-Al sont un peu plus élevées à Bordeaux. De plus, à Bordeaux, les teneurs en Pgsh3SH-Al sont systématiquement plus élevées qu'à Sancerre. Par ailleurs, à Bordeaux, les teneurs en Pgsh3SH-Al sont 2 à 3 fois plus élevées que celle des Pcys3SH, tandis que celles du Pgsh3SH sont 5 à 10 fois supérieures au Pcys3SH.

III. Conclusions

Les expériences réalisées dans ce chapitre nous ont permis d'approfondir les connaissances sur la libération de 3SH dans les vins.

D'une part, nous avons démontré que la contribution des composés insaturés en C₆ tels que le *trans*-2-hexenal et le *trans*-2-hexenol est négligeable. Ces composés ne sont donc pas des précurseurs du 3SH.

D'autre part, deux nouvelles formes précurseurs du 3SH ont pu être mises en évidence : le Pgsh3SH-Al et sa forme bisulfite Pgsh3SH-SO₃. Nous démontrons par la mise en place de méthodes de quantification que ces composés sont présents dans les moûts à des teneurs avoisinant la dizaine voire la centaine de µg/L. Leur biotransformation par la levure au cours de la fermentation alcoolique a également été démontrée. Leur pourcentage de biotransformation en 3SH a été estimé à une valeur proche de 1% pour le Pgsh3SH-Al et avoisinant 0,4% pour le Pgsh3SH-SO₃. Leur contribution comme précurseur du 3SH dans les moûts fait l'objet d'une étude particulière développée dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 7 : ETUDE DE LA CONTRIBUTION DES S-CONJUGUES DES MOÛTS AU POTENTIEL EN 3SH

Depuis quelques années, suite à la découverte dans les moûts des S-conjugés à la cystéine et au glutathion comme précurseurs des thiols volatils participant à l'arôme variétal des vins de Sauvignon (Tominaga *et al.*, 1998b ; Peyrot des Gachons *et al.*, 2002b), les mécanismes impliqués dans la libération des thiols volatils ont été particulièrement étudiés (Grant-Preece *et al.*, 2010 ; Roland 2010e ; Kobayashi *et al.*, 2010). La contribution des S-conjugés a été remise en cause à plusieurs reprises (cf. études bibliographiques). Cependant à ce jour aucune nouvelle forme, autre que le Pcys3SH et le Pgsh3SH, n'a été décrite ou mise en évidence. L'absence de corrélation entre la concentration du Pcys3SH et du Pgsh3SH des moûts et la libération de 3SH, décrite entre autre par Pinu *et al.* (2012) avait déjà été observée par Peyrot des Gachons (2000a) démontrant que la teneur en 3SH d'un vin de Sauvignon était plus étroitement reliée à la proportion de précurseurs du moût disparus au cours de la fermentation qu'à leur quantité initiale.

L'ensemble de ces données bibliographiques, souvent contradictoires et en tous cas dépourvues de fondements scientifiques, nous a conduit à reprendre l'étude de la contribution des S-conjugés à la teneur en 3SH des vins de Sauvignon, en tenant compte de la découverte des nouveaux précurseurs rapportée au chapitre 6. En effet, plusieurs travaux rapportés par la littérature, basés sur des additions de précurseurs deutérés ne considèrent que les précurseurs connus du 3SH c'est à dire le Pcys3SH et le Pgsh3SH. Or, si beaucoup d'études s'accordent à démontrer que la teneur en S-conjugés à la cystéine du moût et la teneur en 3SH du vin correspondant sont mal corrélées, aucune, à notre connaissance, ne propose de nouveaux précurseurs du 3SH dans les moûts de Sauvignon, à part le *trans*-2-hexenal en dépit de sa contribution négligeable à la teneur en 3SH des vins discutée au chapitre 6. Par ailleurs, l'impact de la composition du moût sur le taux de biotransformation n'est que peu considéré.

Tableau 39 : Teneurs en précurseurs (Pcys3SH, Pgsh3SH, Pgsh3SH-Al et Pgsh3SH-SO₃) des fractions obtenues par chromatographie Flash à partir de 5L de moût (Bordeaux, 2011)

	Quantité (nmol/fraction)			
	Pcys3SH	Pgsh3SH	Pgsh3SH-Al	Pgsh3SH-SO ₃
Avant fractionnement	450	3 400	4 200	
(1-20)	30	13	16	36
(21-35)	7	3	1 630	1 377
(36-50)	2	3	209	159
(51-60)	325	16	3	0
(61-71)	46	3 602	192	8
(72-135)	0	111	25	0
(136-255)	0	71	7	0

Dans la première partie de ce mémoire nous avons mis au point une technique de chromatographie semi-préparative (chromatographie Flash) qui a permis, d'une part, de séparer les différentes formes précurseurs connues contenues dans le moût et d'autre part, de mettre en évidence, par fermentation des extraits, de nouveaux composés potentiellement précurseurs de 3SH. Deux de ces composés ont été identifiés, il s'agit du S-3-(hexan-1-al)-glutathion (Pgsh3SH-Al) et de sa forme combinée bisulfite (Pgsh3SH-SO₃) ; ces deux nouvelles formes précurseurs du 3SH sont présentes dans les moûts à des concentrations proches de celles du Pcys3SH et du Pgsh3SH.

Dans ce chapitre, nous déterminerons la contribution réelle de chaque forme sur la teneur en 3SH libéré après fermentation des différentes fractions obtenues. Ce travail met en œuvre des molécules « naturelles » des moûts et non leurs homologues de synthèse.

I. Etude de la libération de 3SH suite à la fermentation des fractions partiellement purifiées.

La technique de fractionnement des précurseurs du 3SH par Chromatographie Flash portait sur un volume conséquent de moût (5 litres) préalablement traité au charbon actif, et percolé sur la cartouche Chromabond Flash RS 330 C₁₈ec 330g (Macherey-Nagel) ; les composés retenus étant élués par un gradient eau-méthanol. Nous avons ainsi obtenu trois fractions dont le fort potentiel en 3SH peut être révélé par la fermentation alcoolique. Deux d'entre elles contiennent du Pcys3SH et du Pgsh3SH. L'identification du Pgsh3SH-Al et de son dérivé bisulfite dans la troisième fraction laissent imaginer que ces composés puissent être à l'origine de la libération de 3SH observée.

Pour rappel, nous avons collecté 255 sous-fractions de 25 mL (Figure 44 A, B et C). Le regroupement des tubes, qui a pour but une diminution du nombre d'échantillons à fermenter, est guidé par l'analyse des formes précurseurs (Pcys3SH, Pgsh3SH, Pgsh3SH-Al et Pgsh3SH-SO₃, Figure 44 A, B et C). Les fractions assemblées sont ensuite évaporées, lyophilisées puis reprises dans 2mL d'eau. La quantité des formes précurseurs de chaque fraction est présentée dans le Tableau 39.

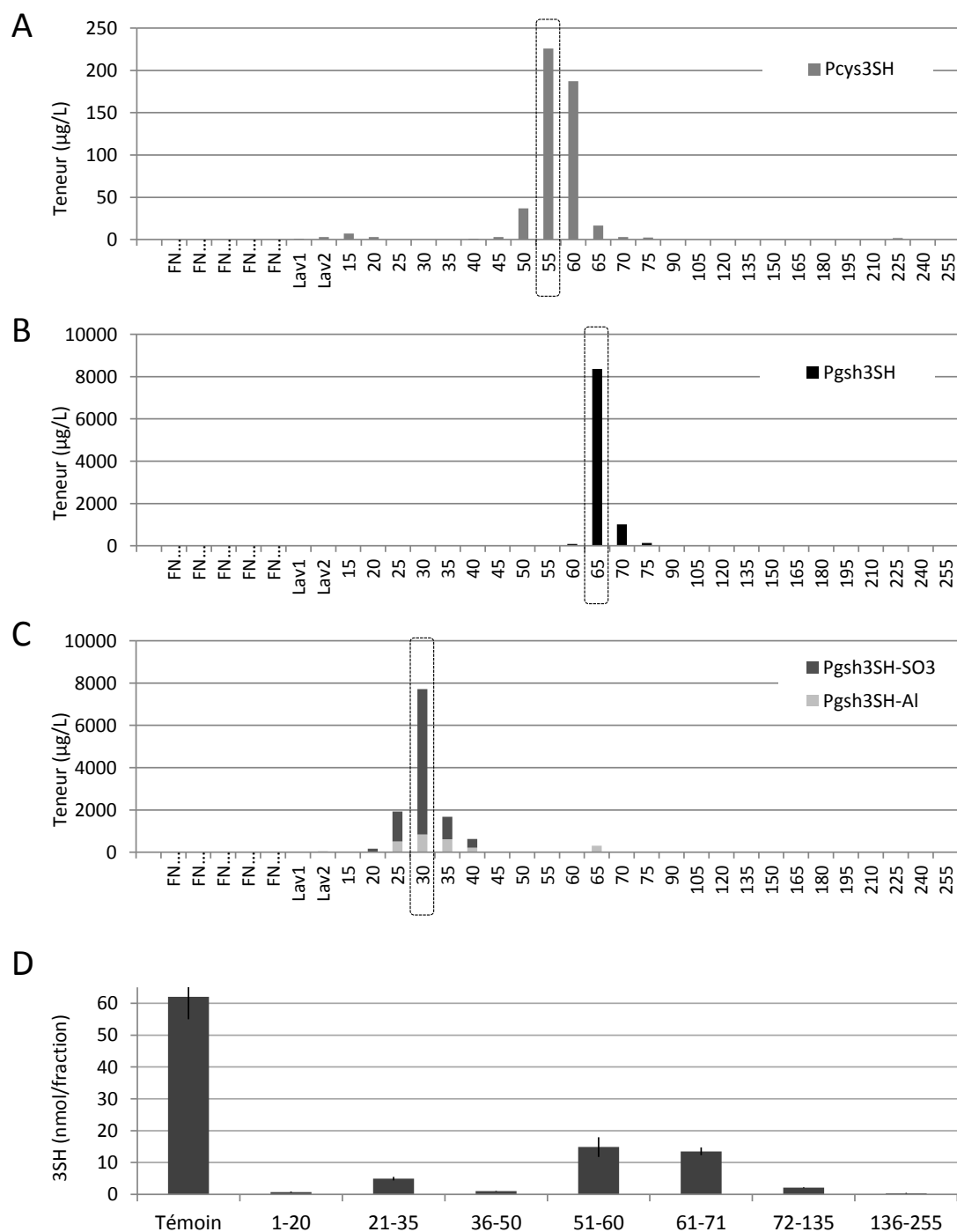


Figure 44 : Dosage des précurseurs cystéinylés (A), glutathionylés (B), et glutathionylés sous forme aldéhydique libre et combinée (C), dans les tubes obtenus en sortie de chromatographie Flash. Les fractions resserrées sont matérialisées par des pointillés. Concentration en 3SH libérée (D) après fermentation des regroupements (n=2) (moût Bordeaux 2011)

La libération du 3SH au cours de la fermentation alcoolique des fractions, présentée dans la 4D, est exprimée en nombre de nmol de 3SH qui serait libéré par la fermentation de l'ensemble de la fraction correspondant à 5L de moût. La modalité Témoin correspond par analogie à la quantité de thiols qui aurait été libérée par fermentation des 5L de moût.

La comparaison des profils de distribution des précurseurs et du 3SH indique clairement qu'il existe un lien entre la présence de précurseurs dans la fraction et la libération du 3SH au cours de la fermentation. En effet, la quantité de 3SH libéré est de l'ordre de 15 nmol « dans » les modalités fermentées à partir des fractions (51-60) et (61-71) associées à la présence de Pcys3SH et de Pgsh3SH alors qu'elle est inférieure à 2 nmol "dans" les fractions dépourvues de précurseurs connus. En termes de contribution, ces deux formes précurseurs expliquent plus de 45% de la concentration totale en 3SH (modalité témoin correspondant à la fermentation du moût). La forme aldéhydique, quant à elle, semble contribuer plus modestement mais serait à l'origine d'environ 9% du 3SH de ce vin.

Ces S-conjugués contribuent donc de façons plus que significatives au potentiel en 3SH des moûts.

Afin de vérifier que la libération est bien associée à ces composés et non à des "contaminants" élués à des temps de rétention proches, nous avons modifié le regroupement initial. Les tubes correspondant au sommet des pics d'intérêt ont été assemblés (représentés dans la 4 A, B et C, en pointillé). Ces nouvelles fractions seront désignées par la suite sous le terme de "fraction resserrée" en opposition aux fractions élargies précédentes. Les tubes 29 à 31 (Pgsh3SH-Al) sont assemblés et ainsi omis de la fraction initiale (21-35). Le Pcys3SH et le Pgsh3SH sont récoltés respectivement par l'assemblage des tubes 55 à 57 et 65 à 67. La pureté relative des composés dans ces regroupements a été estimée par LC-MS (Tableau 40).

Tableau 40 : Estimation du degré de pureté des fractions 29-31 (Pgsh3SH-Al total), 55-57 (Pcys3SH) et 65-67 (Pgsh3SH) par analyse du chromatogramme des ions totaux sur la gamme de masse de m/z 100 à 1000 (LC-MS)

	Tubes	Pureté estimée
Pgsh3SH-Al total	29-31	<10%
Pcys3SH	55-57	47%
Pgsh3SH	65-67	37%

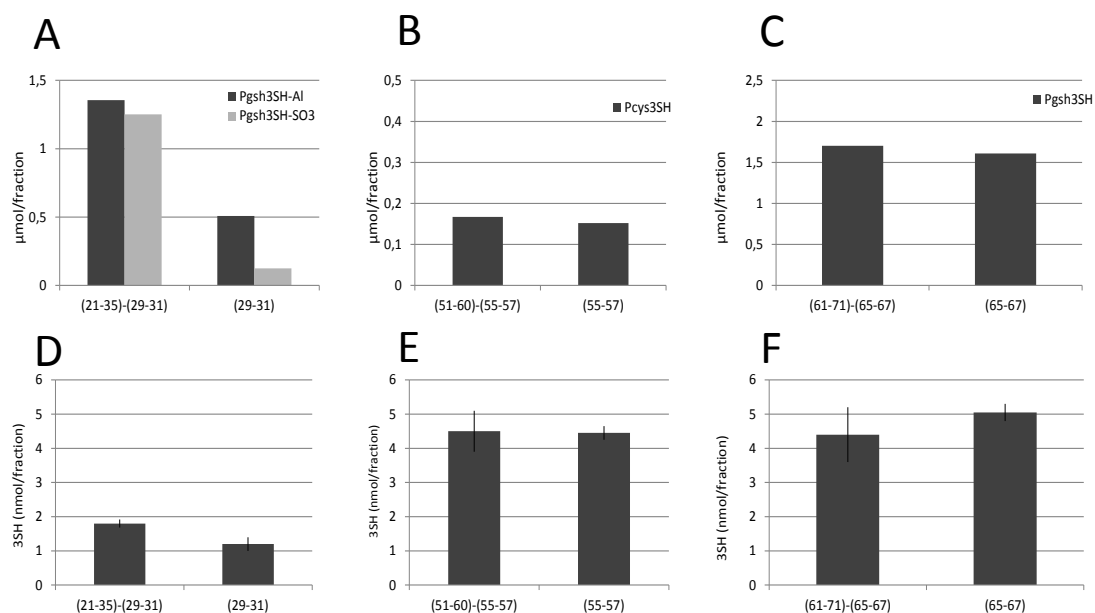


Figure 45 : Dosage des précurseurs glutathionylés sous forme aldéhyde libre et combinée (A), cystéinylés (B) et glutathionylés (C) dans les fractions « élargies » et « resserrées » (n=1), associé à la libération de 3SH en fin de fermentation alcoolique (D, E et F) (n=2)

La pureté relative de la fraction (29-31) est assez faible, puisque que le Pgsh3SH-Al représente moins de 10% des composés présents. Ceci s'explique par le fait que le Pgsh3SH-Al est élué en début de gradient avec l'ensemble des composés à caractère polaire. En revanche, la pureté relative est de l'ordre de 47% pour le Pcys3SH et de 37% pour le Pgsh3SH. Ces pourcentages sont le reflet direct de la résolution de la technique chromatographique. La chromatographie Flash est généralement considérée comme une technique peu résolutive en matrice chargée et complexe. Or, il apparaît ici que les rendements de purification sont bons. Ce qui nous conforte dans le choix de la colonne utilisée.

La fermentation en milieu modèle a été reconduite sur les trois fractions resserrées. Une modalité renfermant la fraction élargie avec omission a également été fermentée. La [Figure 45](#) présente les teneurs en chaque forme précurseur dans le regroupement initial avec omission et dans la fraction resserrée correspondante (Figure 45 A, B et C). La teneur en 3SH libéré est présentée dans la partie basse de la Figure 45 (D, E et F).

Concernant les modalités fermentées en présence des fractions associées au Pcys3SH ([Figure 45 B](#)) ou au Pgsh3SH ([Figure 45 C](#)), la teneur en 3SH libéré au cours de la fermentation est très similaire entre la fraction resserrée et la fraction élargie correspondante avec omission ([Figure 45 E et F](#)). Ainsi, il est fort probable qu'il n'existe pas d'autres composés précurseurs d'arôme dans ces deux regroupements et donc que la totalité du 3SH libéré "dans" les fractions élargies puisse être attribuée à la seule présence de ces composés dans nos conditions expérimentales. Le pourcentage de biotransformation en 3SH est estimé à 2,9 % pour le Pcys3SH et à 0,5 % pour le Pgsh3SH.

Concernant la libération de 3SH à partir du Pgsh3SH-Al ([Figure 45 A et D](#)), il apparaît que, si l'on se place à teneur égale en Pgsh3SH-Al, celle-ci est comparativement plus faible (de l'ordre d'un facteur 2,7) dans la fraction élargie (21-35) avec omission (29-31) que dans la fraction resserrée (29-31). Le pourcentage de biotransformation en 3SH du Pgsh3SH-Al total (forme libre et combinée) est estimé à environ 0,06% pour la fraction (21-35)-(29-31) et à 0,26% pour la fraction (29-31). Sachant que la quantité potentielle de composés contaminants présents dans le regroupement initial élargi est très certainement beaucoup

Tableau 41 : Estimation du taux de participation des trois formes précurseurs au potentiel en 3SH des moûts (%)

	Pcys3SH	Pgsh3SH	Pgsh3SH-AI total	Total
Taux de participation (%)	24	22,2	13,1	59,3

plus importante que dans la fraction resserrée et que le taux de biotransformation est plus faible, alors il est possible d'envisager que la complexité de la fraction (21-39) induise une instabilité du 3SH formé au cours de la fermentation. Suite à la détermination du pourcentage de biotransformation, nous avons estimé la teneur en 3SH qui serait libérée à partir de la totalité du Pgsh3SH-Al contenu dans les moûts à près de 7,8 nmol soit une contribution de l'ordre de 13%.

L'ensemble des résultats obtenus dans ce premier essai de fractionnement des précurseurs du 3SH contenus dans le moût, permettent de calculer la contribution des différentes formes au potentiel en 3SH des moûts. Nous estimons que, dans ce moût du millésime 2011, le Pcys3SH est à l'origine de 24 % de la teneur finale en 3SH du vin, que le Pgsh3SH explique jusqu'à 22% et enfin que le Pgsh3SH-Al pourrait être à l'origine de 13% du 3SH total (Tableau 41). Ainsi, près de 60% du 3SH libéré dans le vin serait expliqué par la présence de ces trois précurseurs S-conjugués.

Ces résultats restent expérimentaux et à confirmer puisqu'ils ne tiennent pas compte d'une part, ni de l'impact de la technique de fractionnement ni, d'autre part, de l'impact de la combinaison bisulfite du Pgsh3SH-Al.

Concernant l'impact de la technique chromatographique, les rendements d'extraction du potentiel en 3SH avaient été estimés à près de 80 % lors du développement de la méthode dans la partie précédente. Ainsi, il est possible que la contribution des S-conjugués soit sous-estimée.

Enfin, nous avons, dans cette étude, considéré uniquement la forme libre du Pgsh3SH-Al puisque l'élution et les étapes de préparation des fractions (regroupement, concentration, lyophilisation ...) ont induit une décomposition de la combinaison bisulfite du Pgsh3SH-SO₃ contenu dans les fractions 21-35. Cependant, il semblerait que dans ce moût (2011), le Pgsh3SH-Al soit majoritairement présent sous sa forme combinée puisqu'il est retrouvé quasiment exclusivement dans les premières fractions alors que sa forme libre est éluée à des temps de rétentions proches du Pgsh3SH.

Ainsi, il apparaît essentiel de confirmer ces résultats sur des moûts d'origines différentes.

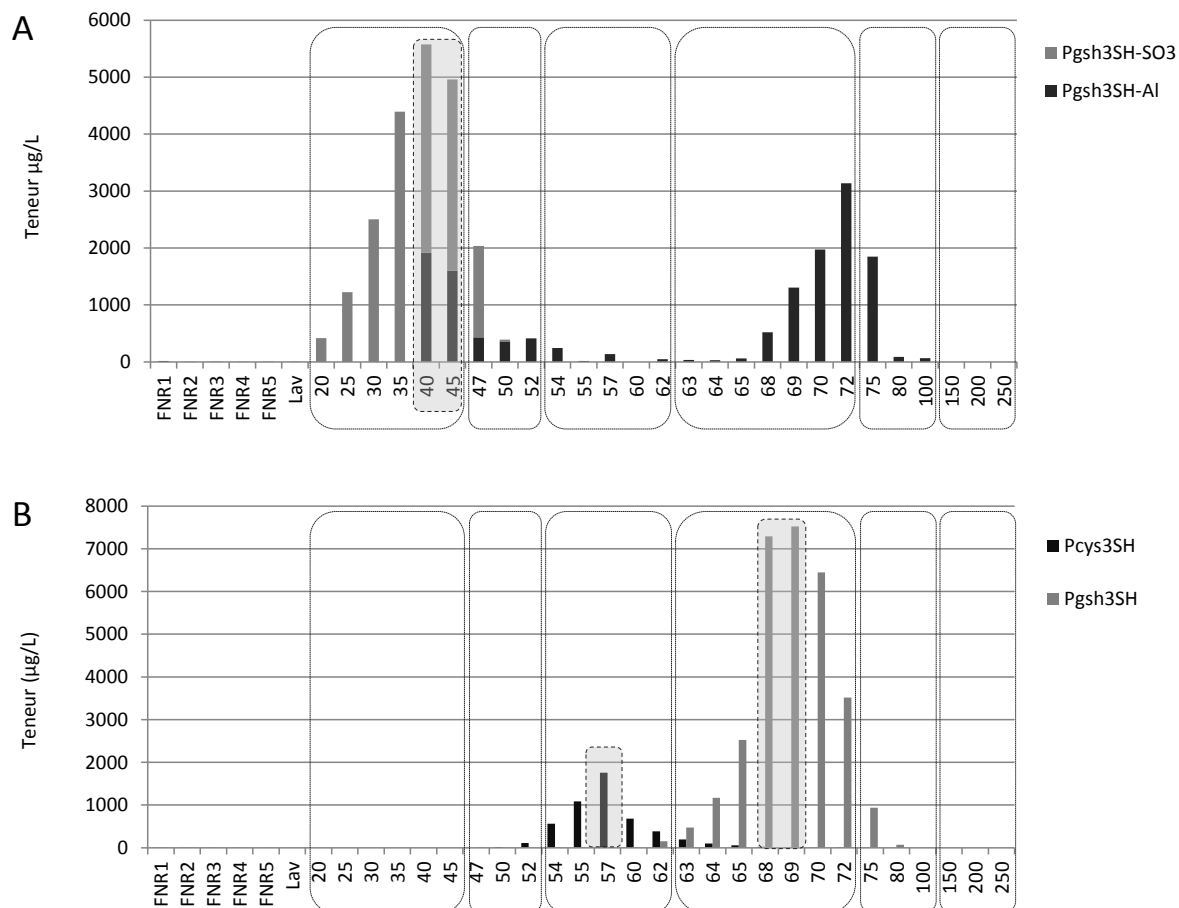


Figure 46 : Dosage des précurseurs glutathionylés sous forme aldéhyde libre et combinée (A), cystéinylés et glutathionylés (B), dans les tubes obtenus en sortie de chromatographie Flash (moût Bordeaux 2013). Les fractions resserrées sont indiquées par les zones grisées

II. Confirmation de l'impact des formes *S*-conjugués

Dans cette partie, nous avons cherché à confirmer les résultats obtenus par la réalisation d'un nouveau fractionnement des formes précurseurs d'un moût de Sauvignon blanc de même origine mais d'un autre millésime (Bordeaux 2013). Au cours de cette étude, nous avons choisi de ne pas traiter le moût au charbon actif avant fractionnement des précurseurs du 3SH afin d'évaluer l'impact du traitement sur le taux de participation des différentes formes de *S*-conjugués au potentiel en 3SH d'une part, et d'autre part, de vérifier que le charbon ne piège pas de composés potentiellement précurseurs du 3SH.

1) Fractionnement des précurseurs du 3SH à partir du moût 2013

Le fractionnement a été réalisé à partir de 5 litres de moût (Bordeaux, 2013), préalablement filtré sur 0,45 μm et percolé sur la cartouche Chromabond Flash RS 330 C₁₈ec 330g (Macherey-Nagel) à 100 mL/min. L'élution est réalisée selon la méthode décrite précédemment. 255 sous fractions de 25 mL sont collectées. Le regroupement des tubes est guidé par l'analyse des formes précurseurs (Pcys3SH, Pgsh3SH, Pgsh3SH-Al et Pgsh3SH-SO₃, [Figure 46](#) A et B). Dans cet essai, les deux formes du Pgsh3SH-Al (libre ou bisulfite) sont détectables. La forme bisulfite est éluée en début de gradient dans les tubes 20 à 50. Une décomposition de la combinaison bisulfite est également observée mais plus faiblement que dans l'essai précédent. La forme aldéhydique libre est retrouvée dans les tubes 68 à 75. Ce pic était quasiment absent lors du fractionnement du moût de 2011 possiblement dû à une dose ou un pouvoir de combinaison plus fort du SO₂ dans ce moût. Concernant le Pcys3SH et le Pgsh3SH, le pouvoir de résolution de la technique reste sensiblement le même, puisque les deux pics sont comme précédemment bien résolus et séparés.

La somme des teneurs en *S*-conjugués retrouvées après fractionnement a été calculée ; il apparaît que le taux de récupération des *S*-conjugués de la méthode chromatographique, tous composés confondus est proche de 80 % ([Figure 47](#) A).

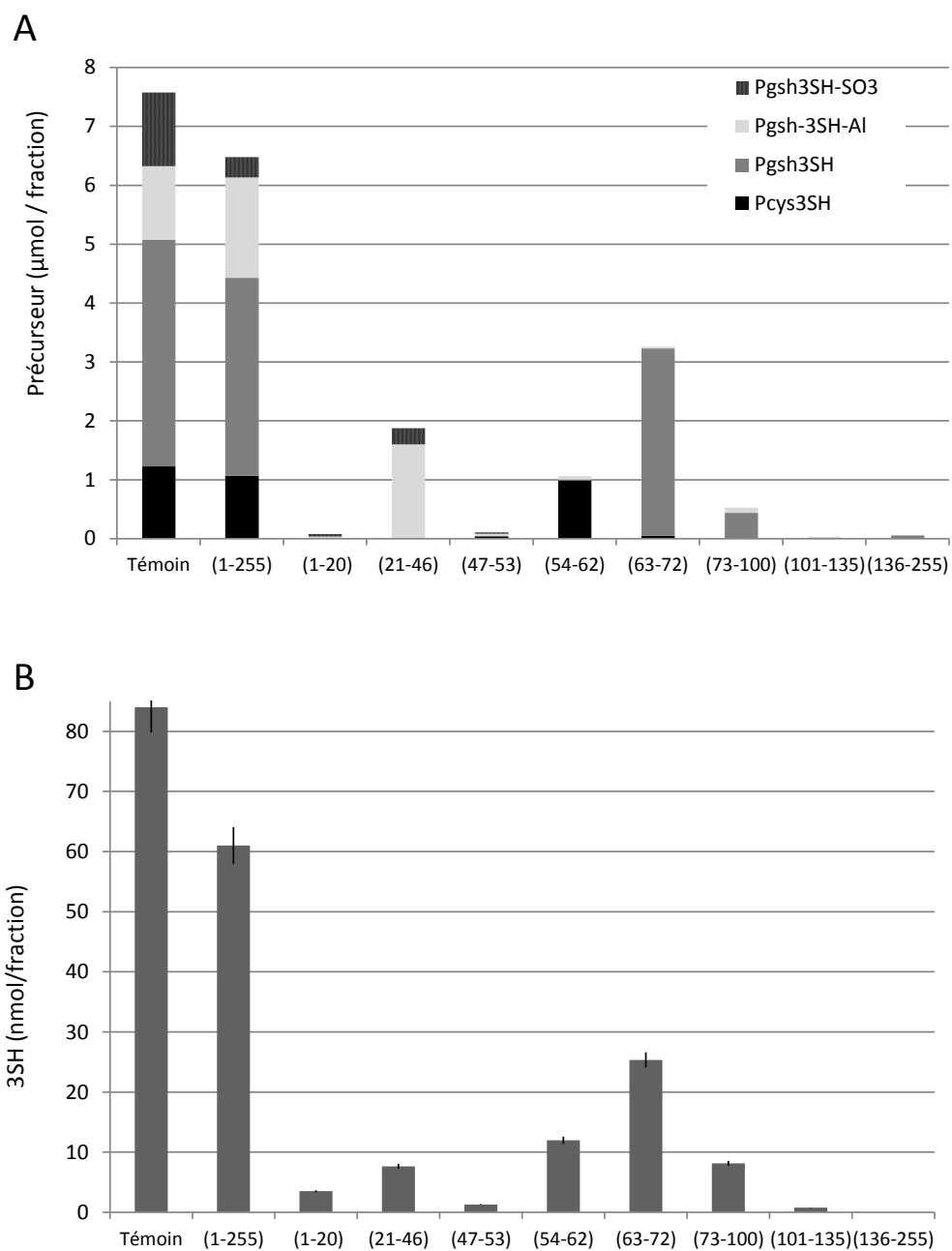


Figure 47 : Dosage de l'ensemble des formes précurseurs dans les fractions obtenues en sortie de chromatographie Flash (A) (n=1), corrélé à la libération de 3SH en fin de fermentation (B), (n=2). (1-255) correspond au regroupement de l'ensemble des tubes

L'assemblage des tubes est effectué aux volumes de rétention des composés d'intérêt tel que présenté dans la [Figure 46](#) A et B. Ainsi, le Pcys3SH est assemblé dans la fraction 54-62 et le Pgsh3SH dans la fraction 63-72 ([Figure 46](#) B). En parallèle, nous avons également sélectionné deux fractions resserrées sur ces composés : respectivement 56-58 et 68-69, représentées sur la figure par les zones grisées. De même, nous avons séparé le pic du Pgsh3SH-SO₃ en deux, formant ainsi les fractions 20-36 et 37-46 afin de préciser le taux de libération de cette fraction ([Figure 46](#) A).

2) Etude de la libération du 3SH suite à la fermentation des fractions pré-purifiées élargies

Comme précédemment, les précurseurs du 3SH de chaque fraction ont été révélés par une étape de fermentation. La [Figure 47](#) présente la distribution et la teneur des S-conjugués disponibles dans chaque fraction ([Figure 47](#) A) et la quantité de 3SH libéré après fermentation de ces mêmes fractions ([Figure 47](#) B). La comparaison des profils de distribution entre les formes S-conjugués et la libération de 3SH après fermentation confirme la participation de l'ensemble de ces composés au potentiel en 3SH des moûts. En effet, la majeure partie des fractions conduisant à une libération de 3SH renferme initialement une des formes précurseur connues, à l'exception de la fraction 1-20 qui induit par sa présence une libération de 3SH de l'ordre de 5% du 3SH total. Dans ce moût, il apparaît que le Pgsh3SH-Al et possiblement le Pgsh3SH-SO₃ contribuent à 8,9 % de la libération totale du 3SH dans le vin correspondant. Tandis que le Pcys3SH et le Pgsh3SH semblent participer respectivement à 14 et 29% du 3SH final. Ainsi, plus de 52 % du 3SH libéré dans le vin témoin s'explique par la présence de ces 4 formes S-conjugués dans le moût. Enfin, il apparaît que la libération en 3SH attribuée à la fraction 1-255 est de 62 nmol alors que la libération du 3SH dans la modalité témoin est de l'ordre de 84 nM (soit un rendement d'extraction de 74%). Sachant que la teneur de l'ensemble des S-conjugués est également affectée par la technique, nous pouvons en conclure que, d'une part, le taux de participation de ces composés est très certainement sous-estimé et d'autre part, que la technique n'induit pas de perte spécifique d'une forme précurseur du 3SH encore inconnue.

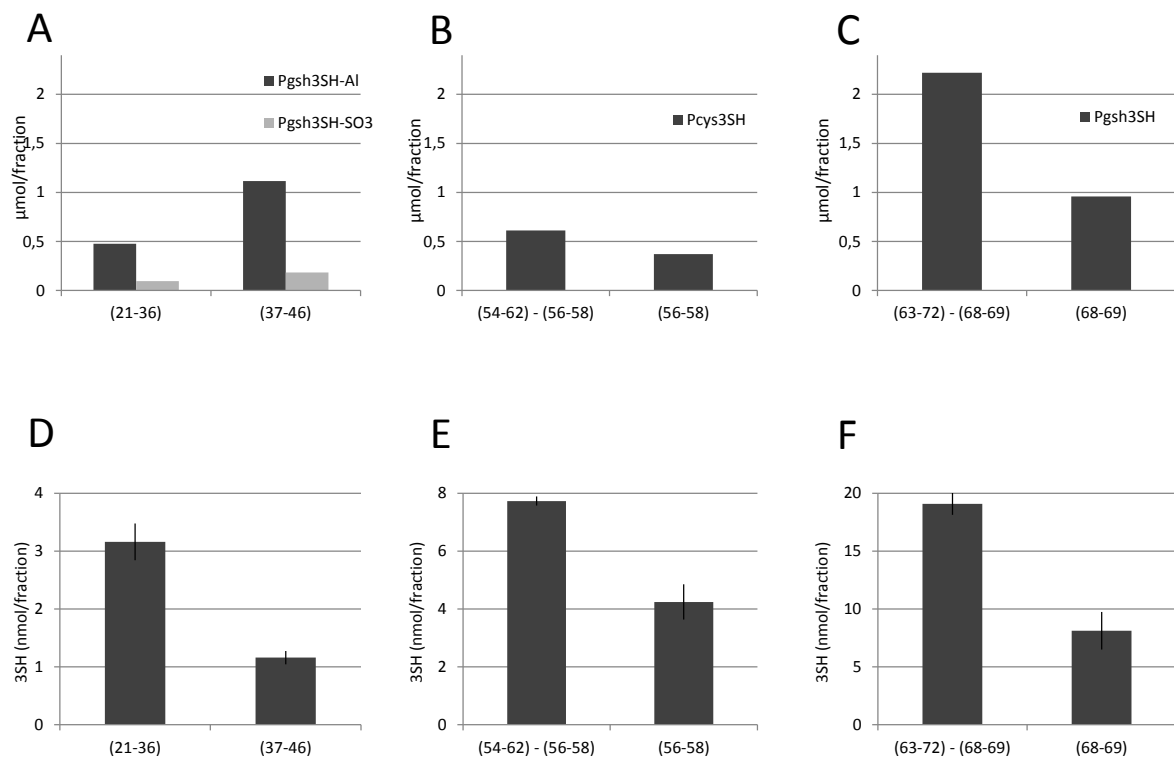


Figure 48 : Dosage des précurseurs glutathionylés sous forme aldéhyde libre et combinée (A), cystéinylés (B) et glutathionylés (C) dans les fractions « élargies » et « resserrées » (n=1), associé à leur libération de 3SH en fin de fermentation alcoolique (D, E et F) (n=2)

Tableau 42 : Estimation du taux de participation des trois formes précurseurs au potentiel en 3SH du moût 2013 (%)

	Pcys3SH	Pgsh3SH	Pgsh3SH-Al total	Total
Taux de participation (%)	17,1	33,9	6-12	57 (63)

3) Etude de la libération du 3SH suite à la fermentation des fractions resserrées

Pour rappel, lors du regroupement des sous-fractions initiales, nous avons également réalisé des regroupements plus fins sur les pics d'intérêt (cf. [Figure 46](#) zones grisées) afin d'affiner la détermination des taux de biotransformations et de participation des différents S-conjugués à la libération du 3SH. La teneur initiale en précurseurs et la teneur libérée en 3SH après fermentation de ces regroupements en milieu modèle sont présentées dans la [Figure 48](#). Il apparaît que la fermentation de la première partie du pic du Pgsh3SH-Al (21-36) conduit à une libération plus importante de 3SH que la fraction 37-46 qui renfermait pourtant jusqu'à deux fois plus de la forme aldéhydique libre et combinée ([Figure 48](#) A et C). Si l'on se place à teneur égale en Pgsh3SH-Al, la libération de 3SH est comparativement plus faible de l'ordre d'un facteur 7 dans la fraction (37-46) que dans la fraction (21-36). Le pourcentage de biotransformation du Pgsh3SH-Al en 3SH serait donc proche de 0,7% à partir de la fraction (21-36) contre 0,1% à partir de la fraction (37-49). En revanche, le taux de libération de 3SH est inchangé pour le Pcys3SH et le Pgsh3SH que la fermentation soit conduite en présence de la fraction resserrée ou de la fraction élargie avec omission ([Figure 48](#) B, C, E, F). Le taux de biotransformation du Pcys3SH peut être estimé à 1,5 % tandis que celui du Pgsh3SH serait de l'ordre de 0,85% dans nos conditions d'analyses.

L'ensemble de ces résultats permet d'estimer pour ce moût, le taux de participation des formes précurseurs au potentiel en 3SH (Tableau 42). Notre calcul prend en compte cette fois, le taux d'extraction de la technique, calculé à partir des formes précurseurs. Il apparaît que le Pcys3SH et le Pgsh3SH participent respectivement à 17 et 34 % de la libération de 3SH à partir du moût 2013. Pour le Pgsh3SH-Al, le taux de participation est moins clair, nous l'estimons entre 6 et 12 %. La variation observée entre les deux fractions contenant le Pgsh3SH-Al pourrait être expliquée d'une part, par la présence concomitante d'un autre composé potentiellement précurseur d'arôme (CPPA) de nature et de structure inconnue dans le regroupement 21-36. Cette hypothèse peut être appuyée par le fait que la fermentation de la fraction 1-20 conduit également à une libération de 3SH alors qu'aucun précurseur connu n'est détecté (figure 47). Ainsi, il est possible d'envisager que le volume de rétention de ce composé (CPPA) pourrait être proche voir chevauchant celui du Pgsh3SH-Al.

Cependant, la participation de cet éventuel composé serait faible puisqu'inférieure à 6%. Cette libération observée après fermentation de la fraction (1-20) qui n'avait pas été détectée lors du fractionnement précédent pourrait être dû soit à une variation de la composition du moût soit au traitement préalable du moût 2011 au charbon actif qui pourrait avoir retenu un composé potentiellement précurseur. D'autre part, la différence observée entre ces deux sous fractions pourrait également être expliquée par la présence d'un composé qui, réagissant avec le 3SH après sa libération, induirait une baisse des quantités détectées. Sachant que le moût n'avait pas été traité au charbon avant fractionnement, il est envisageable que certains composés phénoliques soit présents sous forme de quinones (forme oxydée), composés capables de réagir par addition avec le 3SH (Nikolantonaki *et al.*, 2010b ; Nikolantonaki *et al.*, 2011).

III. Discussion et conclusion

Cette nouvelle approche de fractionnement des précurseurs du 3SH nous a permis de démontrer que les précurseurs de type *S*-conjugués, déjà connus et identifiés dans ce travail, permettent d'expliquer jusqu'à 65% du 3-sulfanylhéxan-1-ol total libéré dans les vins. Ainsi, la libération du 3SH est dépendante de la présence de *S*-(héxan-1-ol)-cystéine, *S*-(héxan-1-ol)-glutathion et *S*-(héxan-1-al)-glutathion dans le moût. Ces composés précurseurs d'arôme participent significativement à la libération du 3SH dans les vins.

Une divergence majeure apparaît donc, entre nos résultats et ceux de Subileau *et al.* (2008) et Roland *et al.* (2010b), selon lesquels les précurseurs cystéinylés et glutathionylés ne génèrent que moins de 10 % du 3SH des vins.

Certes, une partie du 3SH du vin provient du Pgsh3SH-Al dans les moûts. La contribution de ce composé au potentiel en 3SH du moût est significative, générant près de 200 ng/L de 3SH (soit 3 à 4 fois le seuil de perception du 3SH), mais reste inférieure à 20 %.

L'écart entre nos résultats et ceux de Roland *et al.* (2010b) doit être expliqué autrement. Voici une interprétation possible. Ces auteurs ont additionné à des moûts de

Sauvignon blanc des analogues marqués au deutérium du Pcys3SH ou du Pgsh3SH puis par l'analyse des 3SH libérés (marqué ou naturel) ils ont estimé, d'une part, le taux de biotransformation de ces composés au cours de la fermentation d'un moût et d'autre part, ont appliqué ce taux aux précurseurs naturellement présents. Pour le Pcys3SH l'addition a été réalisée à des concentrations (12,5 µg/L) proches de celles observées dans les moûts (Subileau *et al.*, 2008). En revanche, l'analogue du Pgsh3SH est quant à lui ajouté à des doses (12,5 µg/L) dix fois inférieures à celles retrouvées dans les moûts (Roland *et al.*, 2010b). Ceci s'explique très certainement par un artefact lors de l'analyse du Pgsh3SH dans les moûts qui conduit à une sous-estimation des teneurs réelles. En effet, la grande majorité des travaux estiment que le Pgsh3SH est présent à des concentrations proches de 250 µg/L soit dix fois supérieures au Pcys3SH (cf. études bibliographiques). Par ailleurs, dans aucune de ces études l'ajout n'est contrôlé par un dosage. Ainsi, il est envisageable que la quantité relative d'analogue marqué, tout au moins pour le Pgsh3SH, ait été largement surestimée induisant une sous-estimation du pourcentage de biotransformation et donc de participation de ce composé au potentiel en 3SH des moûts. Enfin, il est possible que la présence concomitante d'analogue marqué et de composé naturel dans le moût induise par compétition de substrats une variation du taux de biotransformation de l'une des deux formes. Cette hypothèse peut être facilement vérifiée par l'addition conjointe des formes naturelles et analogues dans un milieu modèle de fermentation. L'analyse des 3SH libérés après fermentation devrait permettre de répondre rapidement à cette hypothèse.

Concernant le Pgsh3SH-Al, nous avons vu que celui-ci pouvait participer significativement à la libération du 3SH. Cependant, la technique de purification utilisée induit un biais dans son analyse puisque, dans les moûts, il semblerait que celui-ci soit majoritairement présent sous sa forme de dérivé bisulfite (Pgsh3SH-SO₃). A l'heure actuelle, l'assimilation de ce composé par les levures est encore mal connue et nécessite des études complémentaires. Par ailleurs, nous avons vu précédemment que la technique de fractionnement utilisant la chromatographie Flash permet d'extraire une grande partie des précurseurs du 3SH contenu dans le moût mais avec une perte inhérente à la technique. En effet, la fermentation de l'ensemble des fractions retenues révélait que la teneur en 3SH relative était de l'ordre de 75% par rapport à la fermentation du moût témoin.

Pour conclure, nos résultats permettent donc d'appuyer le rôle primordial des S-conjugués dans la libération du 3SH puisqu'ils contribuent jusqu'à près de 60% au potentiel en 3SH des moûts. Une part de l'origine du 3SH dans les vins reste à élucider. Cependant nous pouvons formuler quelques hypothèses. Récemment des S-conjugués dipeptidiques, dérivés du glutathion ont été identifiés dans les moûts (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002b ; Capone *et al.*, 2011) mais la teneur de ces composés est très largement inférieure à celle du Pcys3SH. D'ailleurs, nous avons nous-même suivi la trace de ces composés dans les fractions de moûts obtenues par chromatographie Flash (résultats non présentés) et la détection était excessivement faible. Enfin, il semblerait qu'il existe encore des composés non identifiés contribuant de manière plus modérée à une libération du 3SH puisque, dans ce chapitre, nous avons mis en évidence la présence de composé(s) de polarité relativement élevée (contenu(s) dans la fraction regroupant les tubes 1-20) qui conduit à une libération de 3SH en milieu modèle alors qu'aucun précurseur connu n'est détecté. Cependant, la participation de cet éventuel composé serait faible puisqu'inférieure à 6%.

CHAPITRE 8 : ASSIMILATION DES DIFFERENTS PRECURSEURS DES THIOLS VOLATILS DES VINS DE SAUVIGNON BLANC AU COURS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

Les voies métaboliques de la levure impliquées dans l'assimilation de formes précurseurs des thiols volatils des vins de Sauvignon blanc ont été largement étudiées dans cette dernière décennie. Howell *et al.* (2005) ont mis en évidence l'importance de 4 gènes codant pour des C-S lyases par une approche de délétion de gènes codant pour des enzymes possédant une activité β -lyase. Cette étude fut complétée quelques années plus tard (Thibon *et al.*, 2008a), ce qui permis d'identifier l'enzyme Irc7p comme la C-S lyase à l'origine de plus de 90% de la 4MSP dans les vins par la biotransformation du Pcys4MSP. La délétion de ce gène induit une baisse de 40 % dans la biotransformation du Pcys3SH en 3SH. D'autres gènes candidats ont également été étudié; il semblerait donc que la voie de libération du 3SH à partir de son précurseur cystéinylé ne soit pas monogénique (Thibon *et al.*, 2008a). Il a également été montré que la libération des thiols volatils est fortement dépendante du métabolisme azoté. En effet, la teneur initiale en azote assimilable des moûts peut induire une répression catabolique qui conduit à une diminution de la révélation des thiols. Cette répression entraîne, d'une part, une répression transcriptomique du gène *IRC7*. De plus la répression catabolique contrôle l'expression de deux gènes impliqués dans le transport des S-conjugués. Le transport du Pgsh3SH est en partie assuré par la protéine Opt1p (Subileau *et al.*, 2008a) et celui du Pcys3SH dans le milieu intracellulaire semble principalement assuré par la protéine Gap1p (Subileau *et al.*, 2008b).

Si l'assimilation des formes précurseurs et la biotransformation du Pcys3SH en 3SH est relativement bien documentée, en revanche, la voie impliquée dans la biotransformation du Pgsh3SH est loin d'être élucidée. En effet, les enzymes de type β -lyase assurent la rupture de la liaison C-S par une α,β -élimination. Or, dans le cas du Pgsh3SH, le NH_3 de la cystéine en position α n'est pas disponible puisque impliqué dans une liaison peptidique

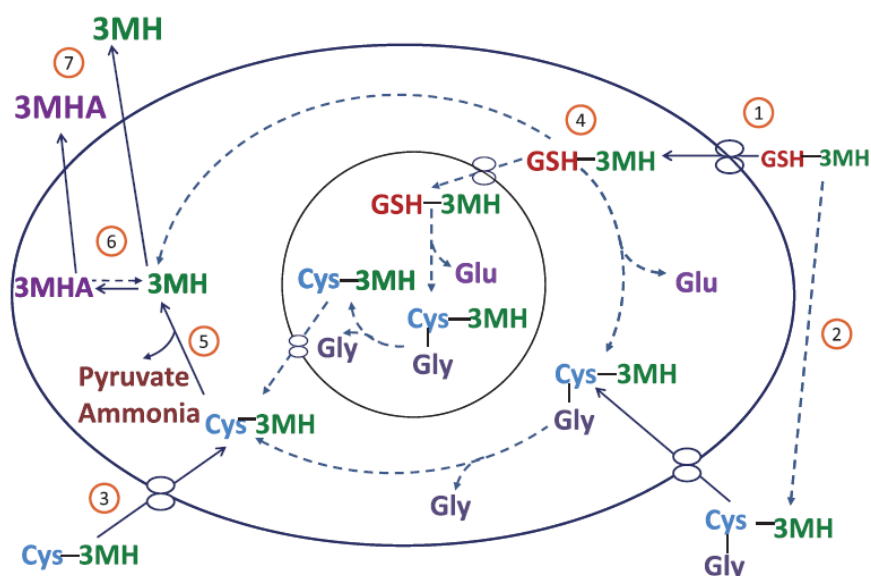


Schéma 6: Schéma de conversion des précurseurs cystéinylés et glutathionylés en 3SH et A3SH. Les flèches pleines correspondent à des étapes validées, alors que les flèches en pointillés sont encore hypothétique (d'après Winter *et al.*, 2011). (1) Subileau *et al.*, 2008b ; (2) Ganguli *et al.*, 2007 ; (3) Subileau *et al.*, 2008a ; (4) Ganguli *et al.*, 2007 ; Jaspers *et al.*, 1985 ; Ubiyovok *et al.*, 2006 ; (5) Tominaga *et al.*, 1998a ; Swiegers *et al.*, 2007a et b ; Thibon *et al.*, 2008b ; (6) Swiegers *et al.*, 2005

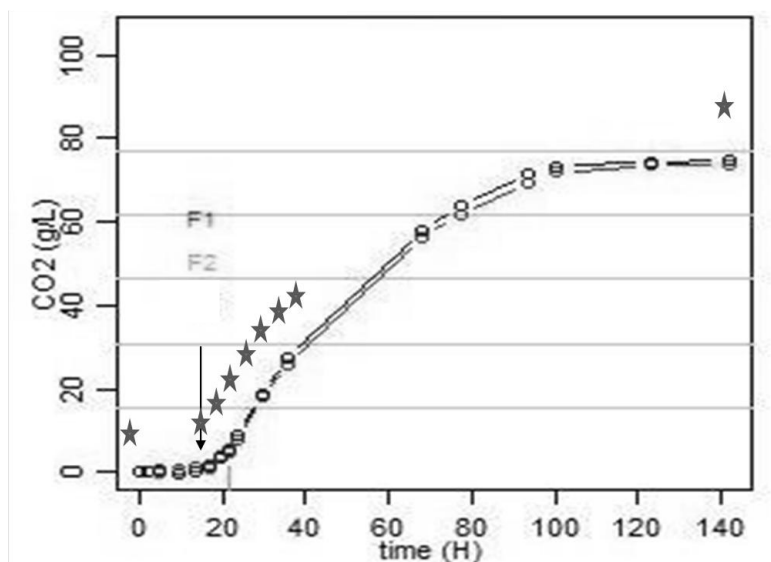


Figure 49 : Cinétique fermentaire présentant le dégagement de CO₂ (g/L) en fonction du temps écoulé après ensemencement. Les étoiles correspondent aux prélèvements effectués en vue de l'analyse des précurseurs. La flèche (→) indique le début de la fermentation alcoolique (premières bulles)

(Winter *et al.*, 2011). Ainsi, il apparaît peu probable que ce composé soit directement biotransformé en 3SH par les gènes préalablement identifiés pour le Pcys3SH.

Différentes voies d'assimilation des formes cystéinylées et glutathionylées conduisant à la libération de 3SH par les levures ont été proposées par Winter *et al.* (2011) et sont présentées dans le Schéma 6.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que le S-3-(hexan-1-al)-glutathion (Pgsh3SH-Al) participait au potentiel en 3SH et donc à la libération du 3SH dans les vins au même titre que le S-3-(hexan-1-ol)-cystéine et le S-3-(hexan-1-ol)-glutathion. En revanche, la participation au potentiel en 3SH (des vins) de la forme bisulfite du S-3-(hexan-1-al)-glutathion doit être précisée.

Afin de mieux comprendre la libération de 3SH dans les vins nous avons étudié le comportement des différentes formes précurseurs au cours de la fermentation alcoolique.

I. Suivi des précurseurs du 3SH au cours de la fermentation alcoolique en milieu modèle

Dans cette partie, nous avons cherché à déterminer les cinétiques d'assimilation des formes précurseurs en milieu modèle. Pour le cela, le milieu modèle est additionné en précurseurs à des teneurs légèrement supérieures à celles retrouvées dans le moût avant d'être ensemencé. Le Pcys3SH est ajouté à 100 µg/L et le Pgsh3SH, le Pgsh3SH-Al et le Pgsh3SH-SO₃ à 600 µg/L. La fermentation est réalisée en milieu modèle à 100g/L de sucres (glucose et fructose). Cette teneur en sucres permet une fermentation rapide en moins de 5 jours tout en étant relativement proche des cinétiques fermentaires observées en œnologie et ceci sans impacter la libération du 3SH.

1) Cinétique fermentaire

La cinétique fermentaire a été suivie par la perte de poids engendrée par le dégagement de CO₂ (Figure 49). La fermentation présente une phase de latence courte (10 h) et s'est

déroulée en 120h. Celle-ci est totale puisque la quantité de CO₂ dégagé est directement proportionnelle à la teneur en sucres initiale. La faible durée de la phase de

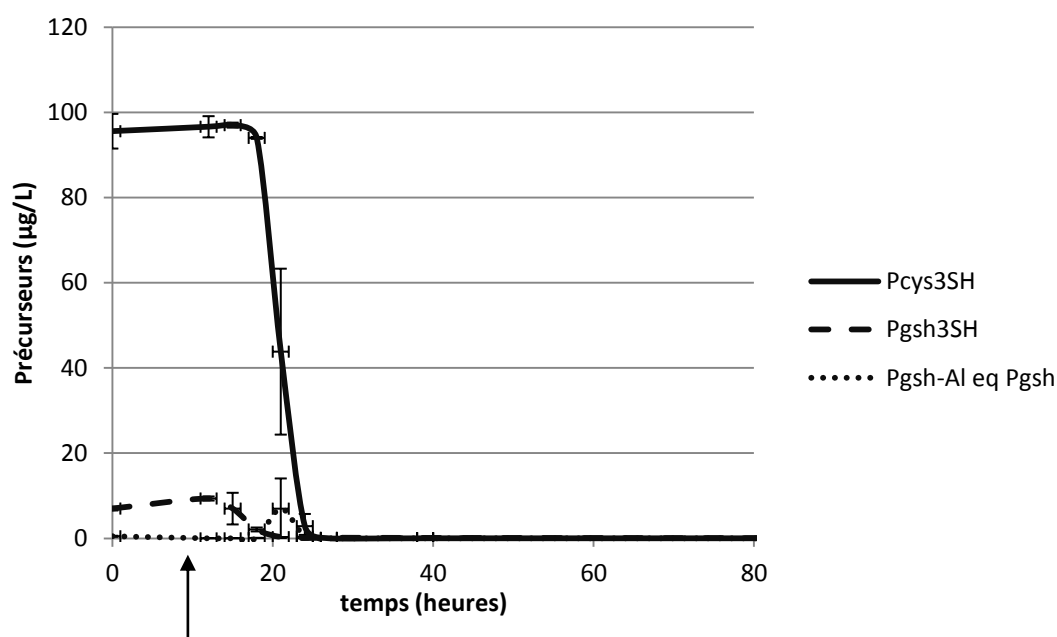


Figure 50 : Cinétique d'assimilation des précurseurs au cours de la fermentation alcoolique d'un milieu modèle additionné en Pcys3SH à 100 µg/L. La flèche (→) indique le début de la fermentation alcoolique (premières bulles) (n=2)

latence s'explique très certainement par la faible teneur en sucres du milieu et par l'absence de SO₂. Un prélèvement du milieu est réalisé en fonction du pourcentage de fermentation c'est-à-dire à intervalle régulier en CO₂ dégagé (0, 2, 5, 15, 20, 40 et 100%). Dans la suite de ce travail, nous avons choisi de présenter les cinétiques d'assimilation en fonction du temps écoulé après ensemencement et non en pourcentage de réaction afin de pouvoir observer l'impact de la phase de latence. Le début de la fermentation alcoolique (premières bulles) est systématiquement indiqué sur les figures par une flèche.

2) Suivi de l'assimilation des précurseurs du 3SH en milieu modèle de fermentation

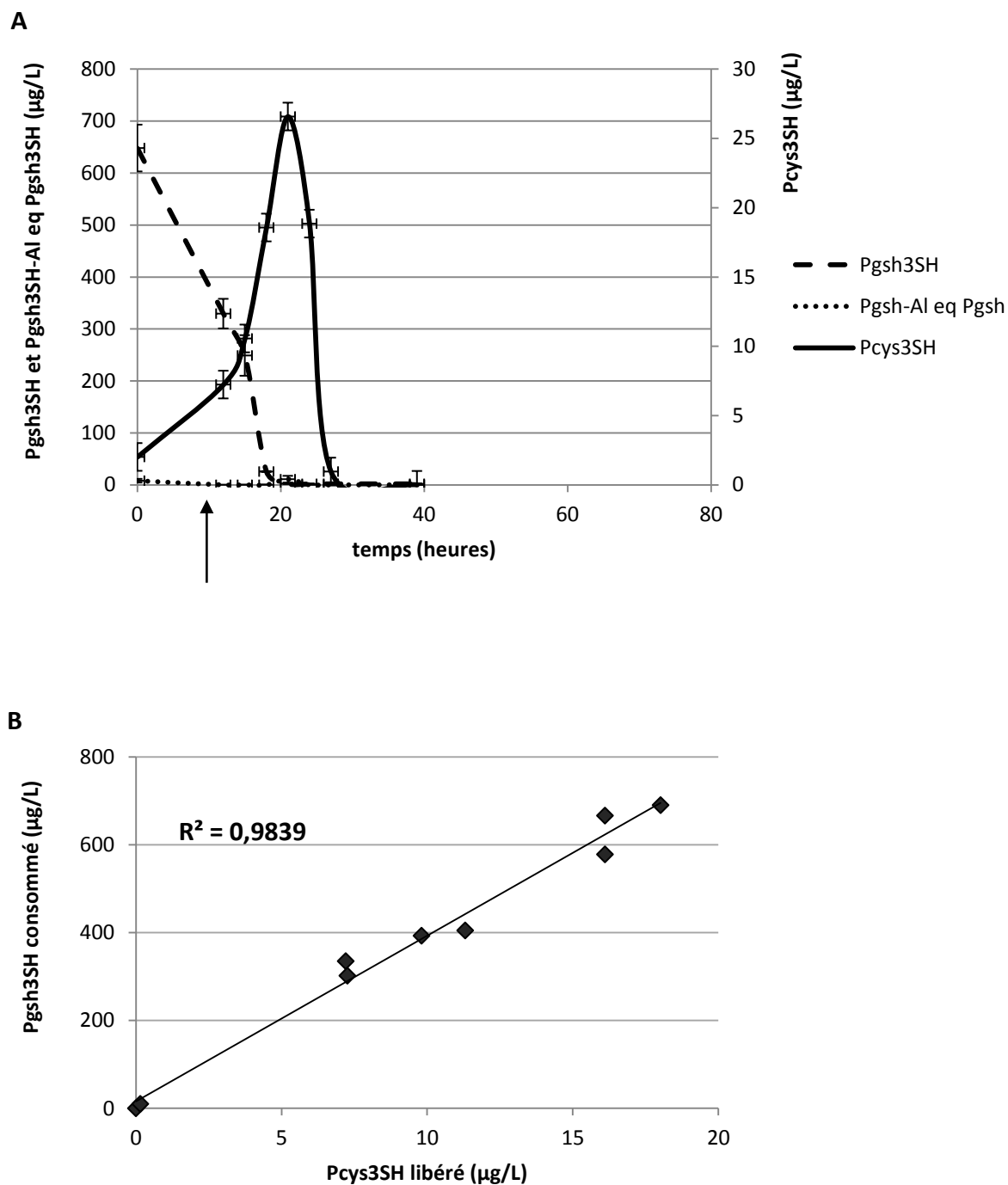
2.1) Assimilation du Pcys3SH au cours de la fermentation

Le dosage des précurseurs cystéinylés au cours de la fermentation alcoolique est illustré sur la Figure 50. La cinétique d'assimilation présente un palier correspondant à environ 20h après ensemencement soit 10h après le début réel de la fermentation avant que la dégradation ne commence.

La vitesse de disparition du Pcys3SH dans le milieu est très rapide. En effet, les précurseurs cystéinylés sont totalement dégradés en moins de 3h. Ainsi après 24h de fermentation, les Pcys3SH ne sont plus disponibles dans le milieu. Ces résultats sont en accord avec la bibliographie (Thibon *et al.*, 2008b). De plus, comme attendu, les Pgsh3SH et Pgsh3SH-Al sont sous forme de traces.

2.2) Assimilation du Pgsh3SH au cours de la fermentation

Le dosage des précurseurs glutathionylés au cours de la fermentation alcoolique (Figure 51) indique que la dégradation de ce précurseur est également très rapide et débute avant celle des précurseurs cystéinylés (Figure 50). En effet, la dégradation débute visiblement 10h après ensemencement soit en fin de phase de latence alors que dans la modalité contenant le Pcys3SH, la dégradation n'avait pas encore débutée à ce stade. Ainsi, il semblerait que la levure assimile plus rapidement le Pgsh3SH que le Pcys3SH.



D'autre part, bien que l'analyse soit réalisée dans le milieu extracellulaire, il apparaît que les Pcys3SH, absents au départ, sont formés au cours de la fermentation pour être dégradés par la suite. Le début de formation du Pcys3SH coïncide avec le début de dégradation du Pgsh3SH.

Une relation linéaire peut être établie entre la teneur en Pgsh3SH consommé par la levure et celle en Pcys3SH libéré et présente un coefficient de corrélation supérieur à 0,98. Il est donc fortement probable que la biotransformation du Pgsh3SH conduise dans un premier temps à la formation de Pcys3SH qui pourra être alors clivé par α,β -élimination sous l'action des enzymes de type β -lyase. En revanche, le rendement de conversion observé est très faible ; il est de l'ordre de 3 %. Ceci peut s'expliquer par le fait que le Pcys3SH est rapidement métabolisé par la levure (Figure 50). En effet, la teneur détectée résulte d'un équilibre entre libération et consommation par les levures. De plus, la conversion du Pgsh3SH vers le Pcys3SH n'est certainement pas totale. D'autre part, l'analyse des précurseurs étant réalisée dans le milieu extracellulaire, les teneurs observées ne seraient donc pas le reflet direct de la concentration réelle puisqu'il est peu probable que les réactions enzymatiques à l'origine de la libération du Pcys3SH se produisent à l'extérieur de la cellule. Ainsi, seuls les composés libérés dans le milieu extracellulaire sont détectés, très certainement suite à une fuite de contenu intracellulaire.

Enfin, concernant l'assimilation rapide du Pgsh3SH par la levure, nous pouvons en conclure d'une part qu'il s'agit d'un transport actif et d'autre part, nous confirmons que ce composé n'est pas importé par les mêmes voies que le Pcys3SH. L'entrée du glutathion dans la levure se faisant dès les premières heures de fermentation (Kumar *et al.*, 2003), il est envisageable que le Pgsh3SH emprunte ces mêmes transporteurs. En effet, le transporteur Opt1p décrit par Subileau *et al.* en 2008, présente une forte affinité pour le glutathion et une affinité un peu inférieure pour les glutathion conjugués (Subileau *et al.*, 2008a). Néanmoins, il est probable que cette affinité soit plus élevée que celle du transporteur Gap1p qui assure l'entrée du Pcys3SH dans la cellule. En effet, ce canal Gap1p n'est pas spécifique à la cystéine mais aux acides aminés en général (Subileau *et al.*, 2008b).

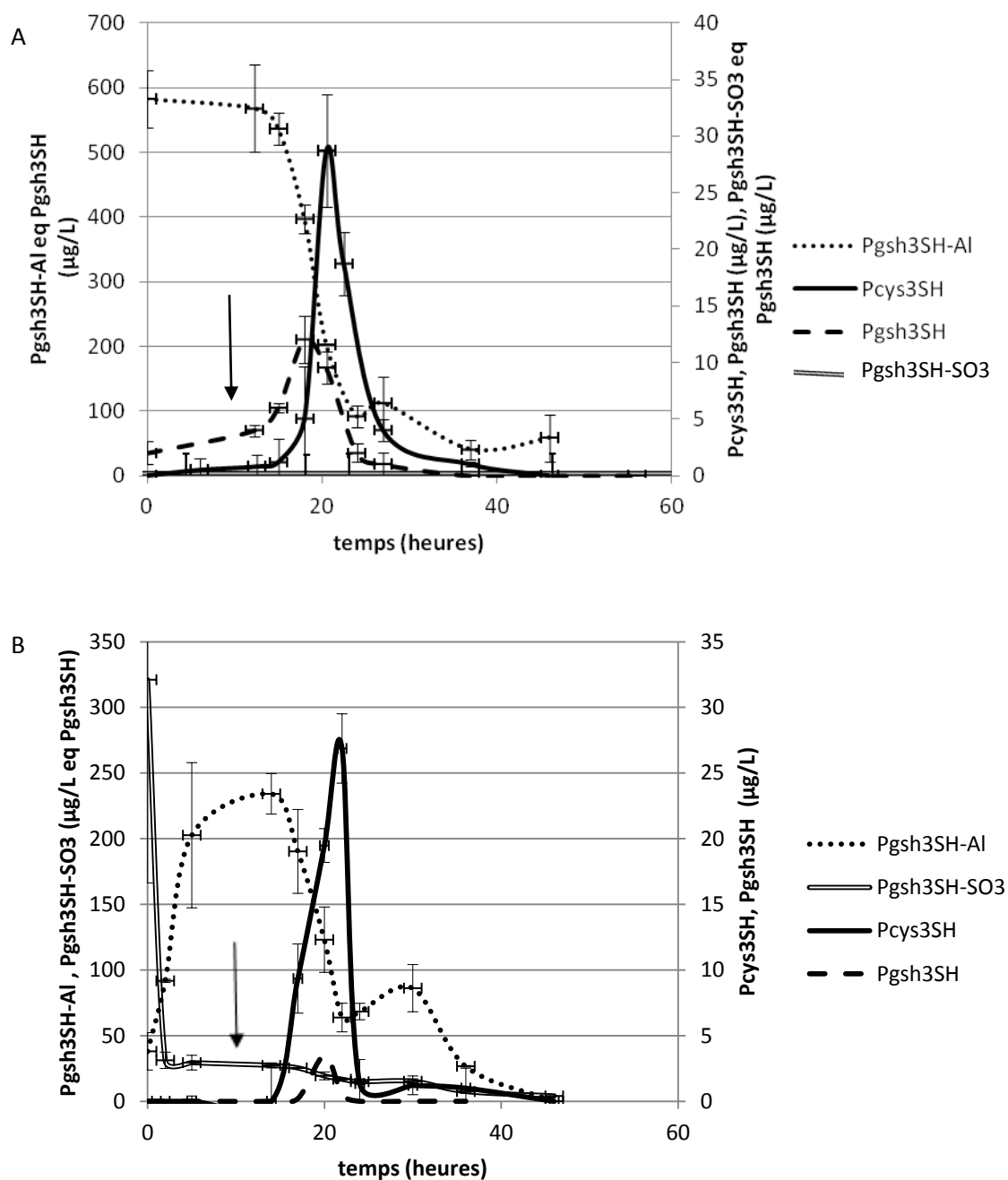


Figure 52 : Suivi de la teneur en précurseurs au cours de la fermentation alcoolique d'un milieu modèle additionné de 600µg/L de Pgsh3SH-Al sous forme libre (A) ou combinée (B), dans un milieu modèle. La flèche (→) indique le début de fermentation alcoolique (premières bulles) (n=2)

2.3) Assimilation des formes libres et combinées du Pgsh3SH-Al au cours de la fermentation

La fermentation du milieu modèle en présence de 600 µg/L de Pgsh3SH-Al sous forme libre ou combinée est présentée en Figure 52.

L'assimilation par les levures du Pgsh3SH-Al sous sa forme libre présente une cinétique comparable à celle du Pgsh3SH ; la disparition de ce composé coïncide avec le début visible de la fermentation alcoolique et un relargage de Pcys3SH dans le milieu extracellulaire (Figure 52 A). Une corrélation linéaire est comme précédemment observée avec un coefficient de détermination de 0,89 (résultats non présentés). Le pic d'accumulation du Pcys3SH dans le milieu est présent 21 heures après ensemencement soit environ à 5% de la fermentation.

La dernière modalité concerne l'évolution du Pgsh3SH-SO₃ au cours de la fermentation alcoolique (Figure 52 B). Ce dernier apparaît fortement instable dans le milieu fermentaire puisque sa décomposition est quasi-totale dès les premières heures après ensemencement. Parallèlement à sa disparition, la forme libre (Pgsh3SH-Al) est détectée dans le milieu extracellulaire. Ainsi, nous pouvons supposer que la combinaison bisulfite est peu stable en milieu modèle. Comme précédemment, l'assimilation du Pgsh3SH-Al ainsi libéré coïncide avec la détection temporaire de Pcys3SH dans le milieu. Ainsi, en conditions modèles, il apparaît que le Pgsh3SH-Al est assimilé au même titre que le Pgsh3SH par les levures *via* la voie métabolique impliquant le Pcys3SH comme intermédiaire de réaction.

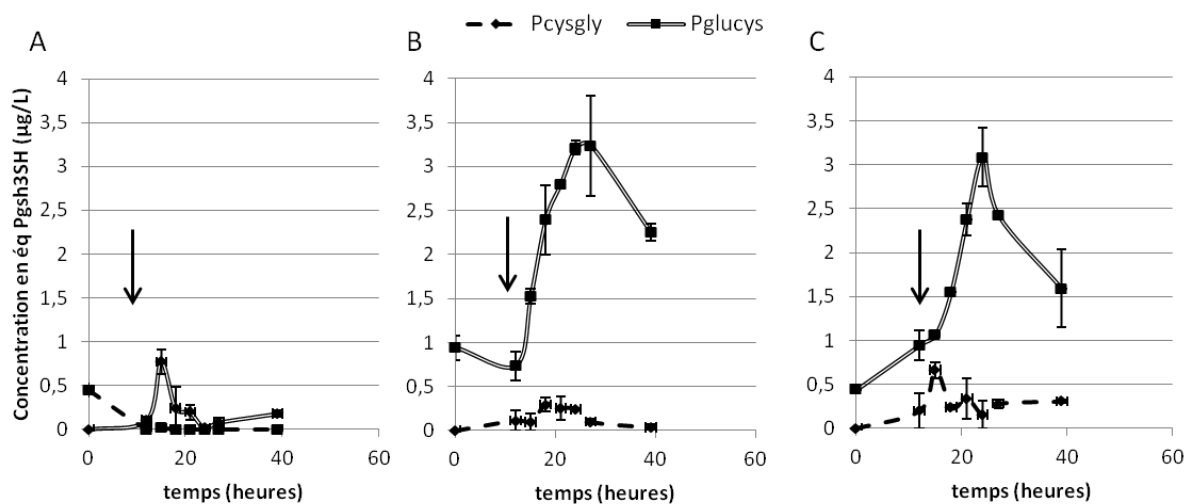


Figure 53 : Dosage composés intermédiaires Pglucys3SH et Pcysgly3SH au cours de la fermentation alcoolique, après supplémentation en Pcys3SH (A), en Pgsh3SH (B) et en Pgsh3SH-Al (C) issus de synthèse chimique (n=2). La flèche (\rightarrow) indique le début de la fermentation alcoolique (premières bulles)

3) Implication des formes S-conjuguées dipeptidiques

La décomposition des S-conjugués au glutathion par la voie d'élimination des xénobiotiques nécessite deux enzymes de type γ -glutamyl-transpeptidase (élimination du acide glutamique) et une carboxypeptidase (hydrolyse de la liaison peptidique entre la cystéine et la glycine) générant ainsi un intermédiaire de dégradation dipeptidique avant la production du S-conjugué à la cystéine correspondant (Jakoby *et al.*, 1984 ; Wolf *et al.*, 1996 ; Wünschmann *et al.*, 2010). L'ordre d'action des enzymes est généralement espèce dépendante.

De plus, la présence de Pcysgly3SH dans le moût a été confirmée par une étude réalisée en 2011 par Capone *et al.* (Capone *et al.*, 2011b). Néanmoins, ce composé est présent à des concentrations beaucoup plus faibles que les Pcys3SH et Pgsh3SH. D'autre part, l'existence de Pglucys3SH a également été mise en évidence dans le moût de Sauvignon blanc en 2002 (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002b). Ainsi, il est probable que ces composés intermédiaires soient issus du métabolisme des levures. Nous avons donc recherché et suivi ces composés au cours de la fermentation alcoolique.

Bien qu'aucune méthode de dosage n'ait été validée pour ces composés, nous les avons recherchés par leur masse exacte et leur temps de rétention (préalablement déterminés au laboratoire, Thibon, communication personnelle) au cours de la fermentation alcoolique.

Il apparaît que les composés intermédiaires sont détectables dans les échantillons mais que leurs concentrations sont faibles (inférieures à 4 μ g/L exprimé en équivalent Pgsh3SH) et en limite de détection de la méthode d'analyse.

Néanmoins, il est possible d'observer l'évolution de leur concentration au cours de l'avancement de la fermentation (Figure 53). Il apparaît que le Pglucys3SH est présent temporairement dans le milieu dans les 24 heures qui suivent l'ensemencement dans les modalités fermentées en présence du Pgsh3SH-Al (Figure 53A) ou du Pgsh3SH (Figure 53B). Il n'est quasiment pas détecté lorsque le milieu initial est supplémenté en Pcys3SH (Figure 53 C). Quant à l'intermédiaire Pcysgly3SH, quelle que soit la modalité considérée, il n'est retrouvé que sous formes de traces. Comme la formation de ces conjugués dipeptidiques à

partir du S-conjugué à la cystéine est peu probable, le signal affecté au Pcysgly3SH est certainement dû à une contamination.

L'accumulation du Pglucys3SH débute après 15 heures, elle est maximum entre 24 et 27 heures puis sa concentration dans le milieu diminue pour tendre vers zéro après 40 heures de fermentation. Il existe donc un léger décalage de son pic d'accumulation par rapport à celui observé pour le Pcys3SH qui était maximum à 21 heures. Quand la formation du Pcys3SH devient inférieure à sa dégradation, l'accumulation du Pglucys3SH est à l'arrêt et donc sa concentration chute drastiquement dans le milieu. Il apparaît donc que l'évolution de ces trois composés est interdépendante, ce qui n'a rien de surprenant puisqu'ils appartiennent tous à la même voie métabolique.

D'après Winter *et al.*, (2011), la voie hypothétique de formation du Pcys3SH à partir du Pgsh3SH impliquait le Pcysgly3SH comme intermédiaire possible (Schéma 66, p234). Or dans ces essais, il semblerait que, chez *S. cerevisiae*, la voie majoritaire dans la dégradation du Pgsh3SH vers le Pcys3SH passe *via* l'intermédiaire de type Pglucys3SH. Ces résultats sont bien évidemment à confirmer puisqu'il est envisageable que l'intermédiaire de réaction soit d'une part, très instable puisque rapidement transformé et d'autre part si la réaction est intracellulaire, il est possible qu'il ne soit pas détectable dans le milieu de fermentation.

4) Conclusions

Ainsi, le dosage des précurseurs réalisé au cours de la fermentation alcoolique a révélé que ces composés sont assimilés par la levure dans les premières heures de la fermentation. Leur vitesse d'assimilation varie selon la forme précurseur, ce qui peut s'expliquer par une affinité variable des systèmes de transport. Par ailleurs, nous démontrons que le Pcys3SH est un métabolite clé dans l'assimilation des différentes formes précurseurs. Enfin, le taux de biotransformation en 3SH des composés S-conjugués a pu être relié à la position des composés dans la voie métabolique d'assimilation. Ces résultats ont été confirmés par le suivi au cours de la fermentation en milieu modèle des molécules précurseurs partiellement purifiées à partir d'un moût de Sauvignon par chromatographie Flash (résultats non présentés).

Pour conclure, le Pgsh3SH et le Pgsh3SH-Al peuvent donc être considérés comme des précurseurs du 3SH au même titre que le Pcys3SH, qui est le dernier intermédiaire de réaction incontournable pour la libération du 3SH dans les vins.

II. Impact du SO₂ sur la biotransformation des précurseurs en 3SH

Si l'importance de l'utilisation de l'anhydride sulfureux (SO₂) dans l'élaboration des vins blancs de Sauvignon n'est plus à démontrer, son impact sur la révélation du potentiel en 3SH et en particulier sa capacité à se combiner au Pgsh3SH-Al requiert des études complémentaires. La participation du Pgsh3SH-SO₃ au potentiel en 3SH et sa biotransformation en 3SH est donc à déterminer. Pour cela, nous avons additionné le composé précédemment synthétisé (cf. chapitre 2) au milieu modèle afin de suivre son évolution au cours de la fermentation alcoolique. Cette étude vise également à déterminer si la présence de SO₂ dans le milieu fermentaire peut, en déplaçant l'équilibre entre la forme libre et la forme combinée, modifier l'assimilation de ce composé. Cette étude a également été élargie aux autres formes de précurseur telles que le Pcys3SH et le Pgsh3SH.

Dans cet essai, les *S*-conjugués précurseurs du 3SH (1μM) ont été fermentés en milieu modèle (160g/L de sucres) additionné ou non de SO₂ (20mg/L). Nous avons choisi de travailler avec des teneurs en sucres supérieures à celles décrites dans le matériel et méthode, pour étaler la phase de latence et ainsi observer de manière plus fine la biotransformation rapide des différentes formes précurseurs. Nous avons également réalisé une modalité renfermant du *trans*-2-hexenal (5μM) et du glutathion (100μM) afin de s'affranchir d'une possible réaction d'addition du glutathion sur le *trans*-2-hexenal. Nous avons démontré dans le chapitre 6 que la contribution du *trans*-2-hexenal à la libération de 3SH était négligeable. Le but ici est de suivre l'évolution des *S*-conjugués au cours de la fermentation alcoolique et donc de vérifier si la levure est capable de produire, même en faible quantité, du Pgsh3SH-Al.

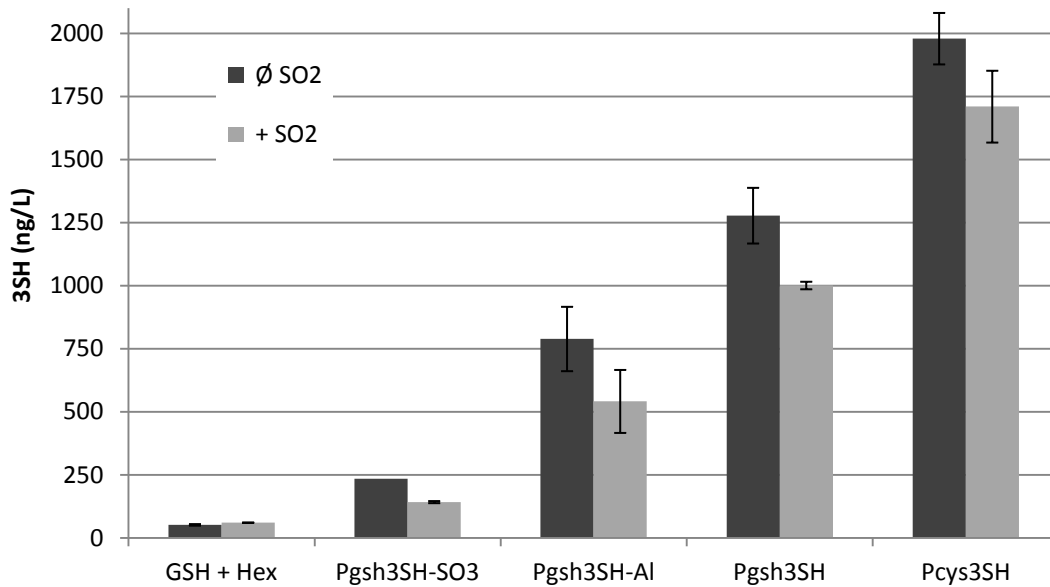


Figure 54 : Dosage du 3SH libéré (ng/L) en fin de fermentation alcoolique, après supplémentation du milieu modèle en S-conjugués (1 μ M) ou en trans-2-hexenal (Hex ; 5 μ M) et glutathion (GSH) en absence (Ø SO₂) ou en présence (+SO₂) de 20 mg/L d'anhydride sulfureux. (n=2)

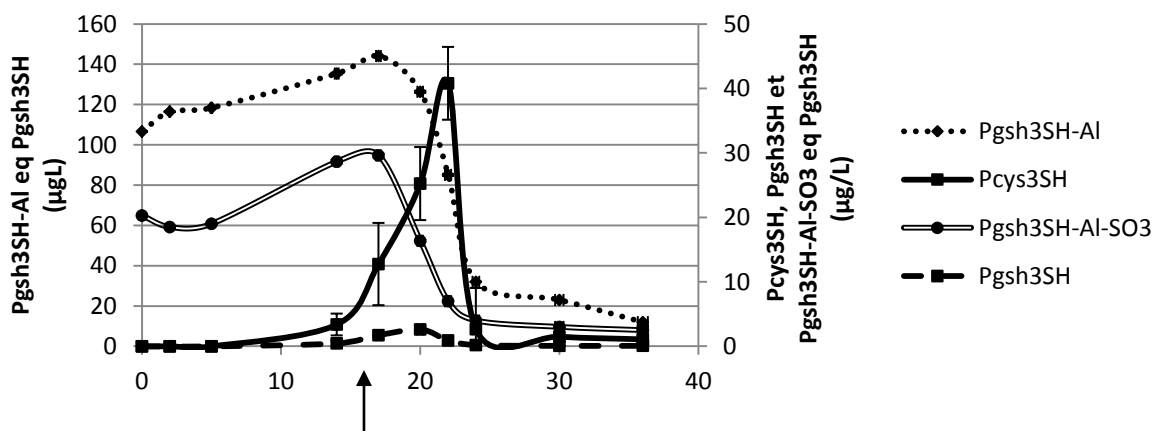


Figure 55 : Cinétique d'assimilation des précurseurs au cours de la fermentation alcoolique d'un milieu modèle additionné de Pgsh3SH-SO₃ en présence de SO₂ (20mg/L). La flèche (→) indique le début de la fermentation alcoolique (premières bulles) (n=2)

1) Impact du SO₂ sur la libération de 3SH en fin de fermentation

La libération du 3SH en fonction de la nature du précurseur additionné au milieu modèle avec ou sans SO₂ est quantifiée en fin de fermentation ([Figure 54](#)).

La libération de 3SH à partir du *trans*-2-hexenal et du glutathion, bien que très faible, n'est pas modifiée par l'addition de SO₂. En revanche, la fermentation des modalités renfermant les S-conjugués (Pgsh3SH-SO₃ ; Pgsh3SH-Al, Pgsh3SH ou Pcys3SH) conduit à une libération de 3SH plus faible (respectivement -40; -30; -22; -14 %) quand le milieu est additionné SO₂ avant ensemencement. Cet effet est particulièrement prononcé dans les modalités fermentées en présence du Pgsh3SH-SO₃ et du Pgsh3SH-Al.

Ainsi, il semblerait que la forme bisulfite Pgsh3SH-SO₃ soit, d'une part, moins bien métabolisée par la levure que la forme libre du composé, et d'autre part, qu'elle soit stabilisée dans le milieu au cours de la phase de latence de la fermentation par l'ajout de SO₂.

2) Evolution des S-conjugués au cours de la fermentation alcoolique

L'évolution des S-conjugués a été suivie au cours de la fermentation pour l'ensemble des modalités. Aucune différence significative n'est observée entre les modalités fermentées en présence ou en absence de SO₂ et du Pcys3SH et Pgsh3SH. Par soucis de lisibilité, seules les cinétiques des modalités fermentées en présence du Pgsh3SH-SO₃ ([Figure 55](#)) et celles en présence du *trans*-2-hexenal et glutathion ([Figure 56](#)) sont présentées.

Dans le milieu dépourvu de SO₂, une dissociation quasi-totale de la combinaison bisulfite avait été observée dès les premières heures de fermentation (cf. [Figure 52](#)). En présence de SO₂ dans le milieu fermentaire ([Figure 55](#)), la combinaison bisulfite du Pgsh3SH-Al est stabilisée au cours de la phase de latence. En effet, la teneur en Pgsh3SH-Al libre est globalement plus faible qu'en absence de SO₂. Néanmoins, le rapport des concentrations de la forme combinée et libre reste très inférieur à un. Ainsi, il est possible que la dose de SO₂ ajoutée ne soit pas suffisante pour stabiliser la

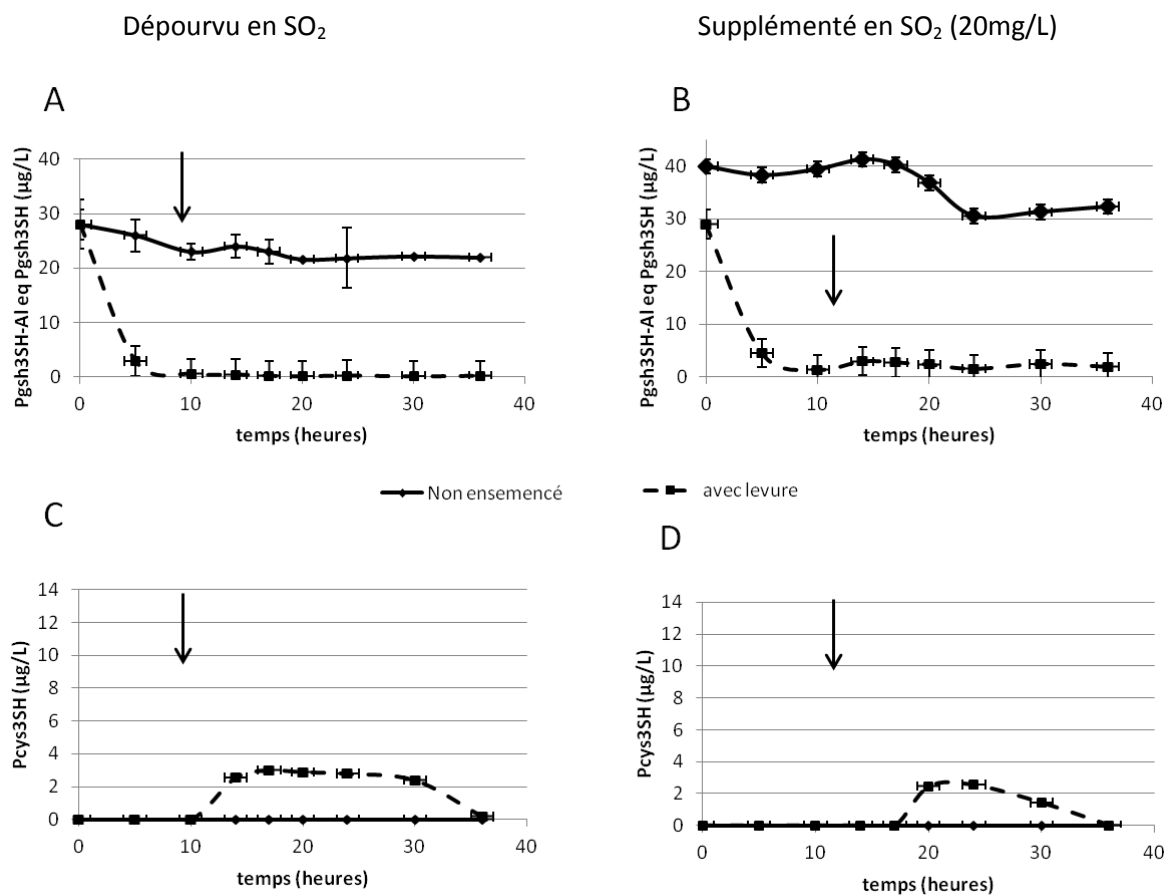


Figure 56 : Evolution des S-conjugués au cours du temps en milieu modèle additionné de *trans*-2-hexenal (5µM) et de glutathion ensemencé par *S. cerevisiae* (Souche X5) ou conservé en conditions identiques et stériles en présence (B et D) ou en absence (A et C) de SO₂. Ne sont détectés que le Pgsh3SH-Al (A et B) et le Pcys3SH (C et D). La flèche (→) indique le début de la fermentation alcoolique (premières bulles) (n=2)

combinaison bisulfite du Pgsh3SH-Al, ce qui reflète une affinité faible du SO₂ pour ce composé.

L'assimilation du Pgsh3SH-Al au cours de la fermentation ne semble pas être influencée par la combinaison bisulfite. Comme précédemment, une production de Pcys3SH est observée 20h après ensemencement, signe que le métabolisme des levures spécifique à l'assimilation de ces composés n'est que peu modifié par la présence de SO₂ dans le milieu. (Figure 55).

La fermentation de la modalité renfermant le *trans*-2-hexenal et le glutathion a également été suivie afin de mieux comprendre le mécanisme d'assimilation et de biotransformation de ces composés en 3SH. L'addition du glutathion sur le *trans*-2-hexenal peut être obtenue par l'action d'enzyme de type glutathion transférase (GST) ou par une simple réaction chimique de Michael. Afin de déterminer le rôle exact de la levure dans la conversion de l'hexenal en 3SH, nous avons ajouté une modalité complémentaire menée en absence des levures. Pour cela, le milieu est conservé stérilement dans les mêmes conditions que la modalité fermentée (Figure 56). Dans la modalité non ensemencée et non sulfitée une formation quasi-instantanée de Pgsh3SH-Al est observée (Figure 56A). Sa teneur reste stable dans les 40 heures qui ont été suivies. En revanche, l'addition des levures dans le milieu induit une chute brutale de sa teneur jusqu'à la disparition totale du composé 5 heures après ensemencement. En présence de SO₂ (Figure 56B), les résultats présentent un profil similaire. Ainsi, il est possible de conclure sur l'origine de la conjugaison du glutathion qui serait réalisée par voie chimique c'est-à-dire par une réaction d'addition sur l'aldéhyde α,β -insaturé. Le rendement de réaction conduisant à la formation de Pgsh3SH-Al est estimé à 1,4%.

Seules les modalités fermentées présentent, bien que faiblement, une production de Pcys3SH (Figure 56 C et D). Ainsi, l'addition du glutathion sur le *trans*-2-hexenal est une réaction chimique présentant un faible rendement mais qui permet la production de S-conjugués qui seront pris en charge par les voies enzymatiques de la levure conduisant à une libération de 3SH. Le faible rendement de la réaction d'addition confirme la participation négligeable de ces composés au potentiel en 3SH.

Tableau 43 : Pourcentages de biotransformation des formes précurseurs de synthèse en 3SH au cours de la fermentation alcoolique en fonction de la dose initiale de SO₂. La moyenne et l'erreur type sont calculées à partir des données obtenues sur l'ensemble des essais effectués

		Taux de biotransformation (%)		
Composé		Moyenne	Erreur type	Répétition
Sans SO ₂	Pcys3SH	2,3	0,30	8
	Pgsh3SH	1,0	0,12	8
	Pgsh3SH-Al	0,8	0,36	4
	Pgsh3SH-SO ₃	0,4	0,08	4
	<i>trans</i> -2-Hexenal	0,007	0,01	4
Avec SO ₂ (20mg/L)	Pcys3SH	1,6	0,06	4
	Pgsh3SH	0,6	0,05	4
	Pgsh3SH-Al	0,4	0,09	4
	Pgsh3SH-SO ₃	0,3	0,10	4
	<i>trans</i> -2-Hexenal	0,008	0,005	4

III. Pourcentages de transformation des précurseurs en 3SH au cours de la fermentation alcoolique

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces essais nous permet de déterminer le taux de biotransformation en 3SH des différentes molécules identifiées à ce jour comme composante du potentiel en 3SH. Afin d'affiner nos calculs, nous avons intégré l'ensemble des résultats obtenus depuis le début de ce travail ; le nombre de répétition de fermentation indépendantes est précisé dans le Tableau 43. Nous avons différencié le taux de biotransformation en fonction la teneur en SO_2 du milieu modèle (Tableau 43).

Comme attendu, la majeure partie des précurseurs ne se transforme pas en arôme. Nous confirmons que le taux de biotransformation est dépendant de la position du composé dans le flux métabolique de la voie impliquant la dégradation de S-conjugués au glutathion. En effet, le rendement est d'autant plus affecté que le nombre d'étapes séparant le composé du thiol est important ; chaque étape induisant une perte de composé. Le taux de biotransformation calculé à partir de l'hexenal est d'autant plus affecté qu'il semblerait que la première étape d'addition n'est pas réalisée par voie enzymatique. La présence de SO_2 dans le milieu (condition représentative de celles rencontrées en œnologie) semble abaisser encore le rendement de biotransformation. Ceci est particulièrement vrai dans le cas du Pgsh3SH-Al. Il est fort probable que la présence de SO_2 conduise à la formation de son dérivé bisulfite (Pgsh3SH- SO_3) qui est plus difficilement assimilé par la levure.

Tableau 44 : Taux de conversion du 3SH en A3SH, selon la forme précurseur supplémentée et selon la concentration en SO₂ du milieu (n=2)

Précurseurs	Taux de conversion (%)	
	Sans SO ₂	20mg/L de SO ₂
<i>trans</i> -2-hexenal + Glutathion	22,9 ± 7,4	26,5 ± 6,4
Pgsh3SH-SO ₃	6,2 ± 1,1	10,6 ± 1,7
Pgsh3SH-Al	2,1 ± 0,1	4,1 ± 1,4
Pgsh3SH	1,3 ± 0,3	1,3 ± 0,2
Pcys3SH	0,7 ± 0,1	1,4 ± 0,2

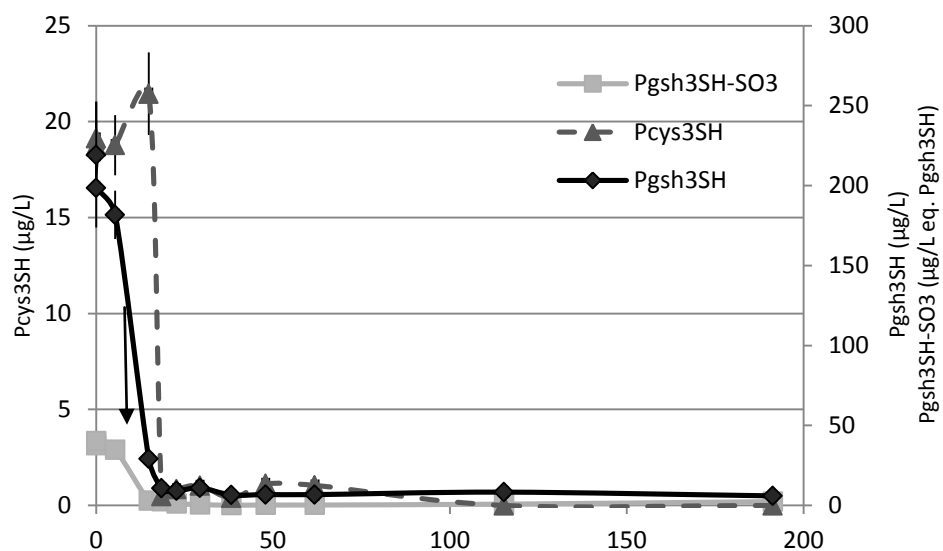
IV. Etude de la contribution des précurseurs à la formation de l'acétate de 3SH au cours de la fermentation

L'acétate de 3SH ou A3SH est formé à partir du 3SH au cours de la fermentation, par une réaction d'estérification (Swiergers *et al.*, 2007a). Il a été démontré que sa formation n'est pas directement dépendante de la concentration en 3SH du vin. Elle serait influencée par le niveau d'expression des enzymes d'estérification *ATF1* et *ATF2* plutôt que par le substrat disponible (Lilly *et al.*, 2000, Verstrepren *et al.*, 2003). Récemment, une étude a démontré que la nature du précurseur à l'origine de la formation du 3SH libéré par la fermentation alcoolique pouvait également influencer le taux d'estérification du 3SH en acétate de 3SH. En effet, celui-ci est plus élevé lorsque la fermentation est conduite en milieu modèle supplémenté en Pgsh3SH plutôt qu'en Pcys3SH (Winter *et al.*, 2011).

Dans cette partie, nous avons cherché à déterminer le taux d'estérification du 3SH en A3SH dans les modalités conduites précédemment (Tableau 44). Ainsi nous pourrions étudier l'impact de la forme précurseurs utilisés et l'impact de la présence du SO₂ dans le milieu initial sur la production d'A3SH.

En absence de SO₂, il apparaît que le taux de conversion du 3SH en A3SH est fortement dépendant du précurseur considéré et qu'il est inversement proportionnel au taux de biotransformation du précurseur en 3SH. En effet, l'estérification du 3SH est inférieure à 1 % après fermentation en présence du Pcys3SH alors qu'elle est de l'ordre de 23% pour la modalité issue de l'addition du glutathion sur le *trans*-2-hexenal. La présence du SO₂ dans le milieu semble être favorable à la conversion du 3SH en A3SH. En effet, la modalité supplémentée en SO₂ permet d'obtenir une conversion du 3SH en A3SH plus importante, sauf dans le cas du Pgsh3SH. Ainsi, en présence de SO₂, les concentrations finales en 3SH seront légèrement inférieures puisqu'une partie sera convertie en A3SH. Le taux de conversion du 3SH élevé lorsque celui-ci est libéré à partir des formes Pgsh3SH-Al pourrait expliquer une partie de la perte en 3SH ; cependant ce phénomène reste minoritaire et ne modifie que faiblement le taux de biotransformation des précurseur en 3SH précédemment calculé.

A



B

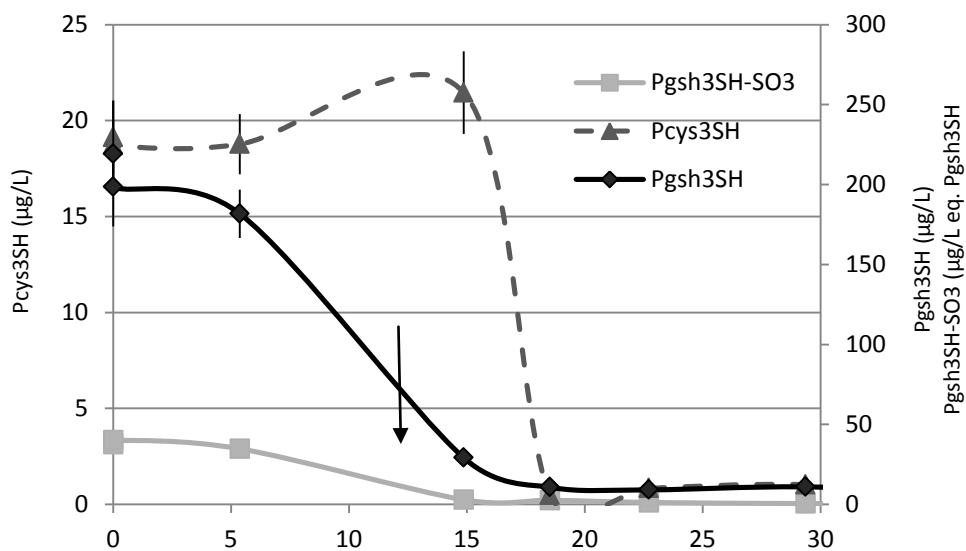


Figure 57 : Assimilation des formes précurseurs (Pcys3SH, Pgsh3SH et Pgsh3SH-SO₃) au cours de la fermentation alcoolique (A) d'un moût de Sauvignon blanc (2012). B montre les mêmes données pour les premières heures de fermentation. La flèche (→) indique le début de la fermentation alcoolique (premières bulles) (n=2)

V. Cinétique d'assimilation des précurseurs par la levure au cours de la fermentation alcoolique d'un moût de Sauvignon blanc

Afin de déterminer si les observations réalisées en milieu modèle sont représentatives des conditions œnologiques, nous avons suivi l'évolution des formes précurseurs, au cours de la fermentation alcoolique d'un moût de Sauvignon blanc de Bordeaux du millésime 2012.

Le suivi au cours de la fermentation du moût présenté dans la figure 57 confirme que l'ensemble des précurseurs sont assimilés dès le premier jour de fermentation selon la même cinétique qu'en conditions modèles. En effet, le Pgsh3SH est dégradé très rapidement, c'est-à-dire dans les premières heures après ensemencement avant même le début visible de la fermentation alcoolique. Son assimilation est totale après 20 heures.

Lorsque la teneur en Pgsh3SH commence à diminuer, une augmentation de celle en Pcys3SH est observée jusqu'à l'assimilation totale du Pgsh3SH. L'épuisement de celui engendre un arrêt dans la synthèse du Pcys3SH et sa consommation par les levures conduit à sa disparition après 20 heures. Cette étroite relation confirme bien le lien entre ces deux composés.

Concernant le Pgsh3SH-SO₃, il semblerait que dans le moût utilisé, (i) seule la forme bisulfite de ce composé est présente et (ii) ceci à faibles quantités (concentration inférieure à 40 µg/L). Malgré tout, il apparaît que le Pgsh3SH-SO₃ est consommé en début de fermentation selon une cinétique de dégradation similaire à celle du Pgsh3SH.

Ainsi, nous confirmons l'assimilation de l'ensemble des S-conjugués précurseurs du 3SH par les levures au cours de la fermentation alcoolique en condition œnologique.

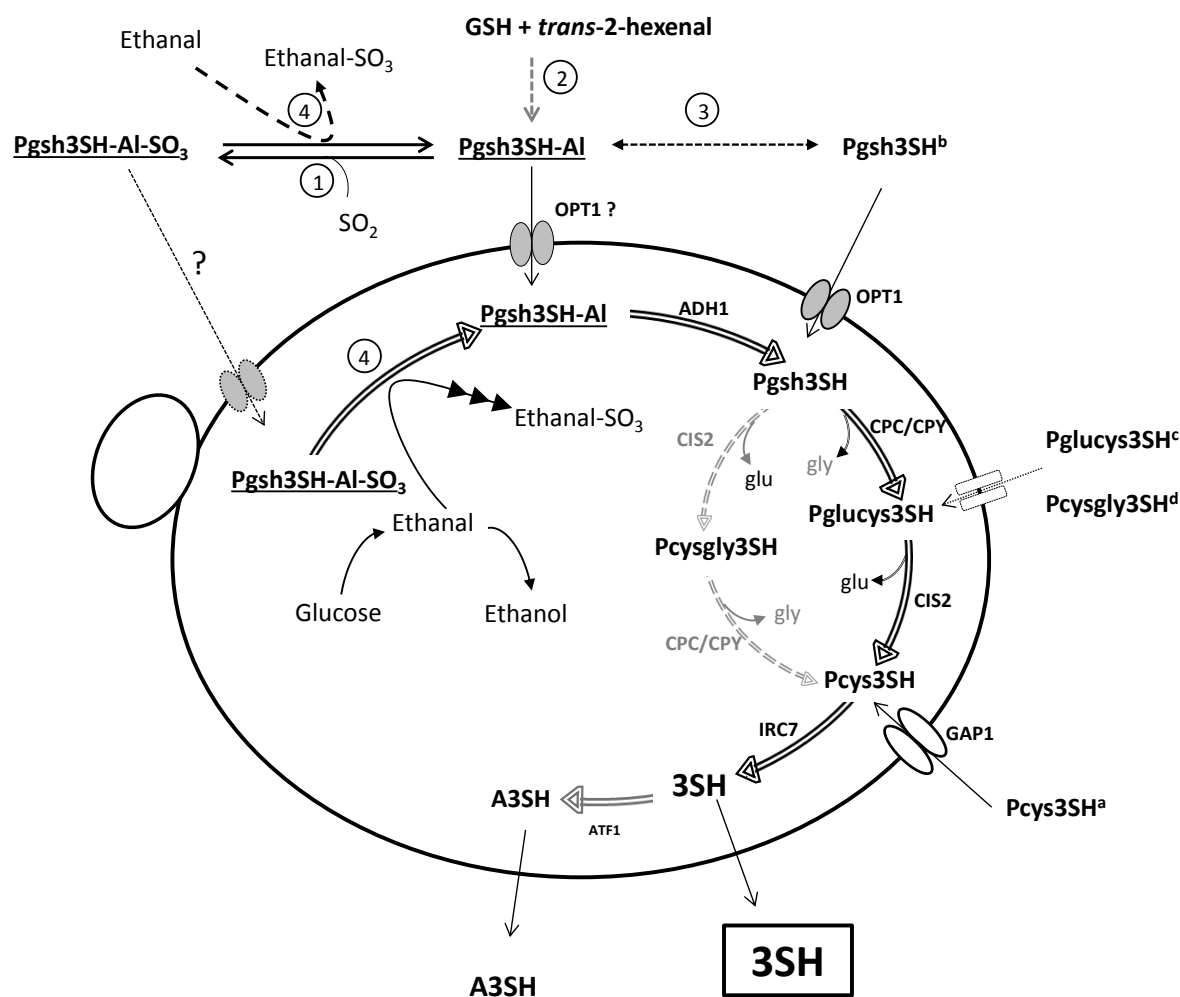


Figure 58 : Voie proposée d'assimilation des formes précurseurs par la levure au cours de la fermentation alcoolique et flux métabolique conduisant à la libération de 3SH dans les vins

Les réactions chimiques sont indiquées par un chiffre; avec ⁽¹⁾ addition nucléophile, ⁽²⁾ addition de Michaël, ⁽³⁾ Oxydoréduction et ⁽⁴⁾ décomposition de la combinaison bisulfite par compétition de substrat.

Les enzymes ou transporteurs intervenant dans cette voie sont indiqués en lettres capitales à chaque étape.

Les annotations en indice indiquent que la molécule a déjà été retrouvée dans les moûts avec ^(a) première identification du S-3-(hexan-1-ol)-cystéine dans les moûts (Tominaga et al., 1995; Tominaga et al., 1998b), ^(b) du S-3-(hexan-1-ol)-glutathion (Peyrot des Gachons, Tominaga et al., 2002b), ^(c) mise en évidence de l'existence du S-3-(hexan-1-ol)-glutamylcystéine (Peyrot des Gachons 2000a), identification dans le fruit de la passion (Fedrizzi et al., 2012), ^(d) identification du S-3-(hexan-1-ol)-cystéinyglycine dans le moût (Capone et al., 2011b). Les composés soulignés sont nouvellement identifiés.

Le transport du Pgsh3SH dans la cellule est assuré par OPT1 (Subileau et al., 2008a) et celui du Pcys3SH par le transporteur GAP1 (Subileau et al., 2008a). La réduction de hexenal en alcool est effectuée par une enzyme de type alcool déshydrogénase (ADH1, (Harsch et al., 2013), les S-conjugués au glutathion sont clivés par la γ -glutamyltranspeptidase CIS2 (Paz Santiago Calderon 2014) et par des peptidase CPC, ou CPY. Le clivage de la liaison C-S libérant le 3SH est effectué par la β -lyase IRC7 ((Thibon et al., 2008b ; Paz Santiago Calderon, 2014) et l'estérification en A3SH par ATF1 (Swiegers et al., 2006 ; Paz Santiago Calderon, 2014)

II. Conclusion

Le suivi des formes précurseurs au cours de la fermentation alcoolique d'un moût de Sauvignon blanc et d'un milieu modèle nous a permis de déterminer les cinétiques d'assimilation ainsi que les flux métaboliques de *S. cerevisiae* impliqués dans la libération du 3SH.

Nous avons pu démontrer que le Pcys3SH était le composé clé dans la libération du 3SH. En effet, ce composé est systématiquement détecté dans le milieu lorsque la fermentation est réalisée en présence du Pgsh3SH ou du Pgsh3SH-Al. Il semblerait que le Pgsh3SH-Al soit, dans un premier temps, réduit en alcool correspondant (Pgsh3SH), puis clivé en S-cystéine (Pcys3SH) avant d'être converti en thiol volatil (3SH). La fermentation des formes glutathionylées a également permis de mettre en évidence pour la première fois un intermédiaire de réaction entre le Pgsh3SH et le Pcys3SH : le S-3-(hexan-1-ol)-glutamylcystéine (Pglucys3SH). Nous confirmons une nouvelle fois que la libération de 3SH à partir du *trans*-2-hexenal (en présence de glutathion dans le milieu) est négligeable.

Nous avons également démontré que le SO₂ peut impacter la révélation du potentiel en 3SH au cours de la fermentation alcoolique. En présence de SO₂, le taux de biotransformation du Pgsh3SH-Al en 3SH est abaissé, probablement dû à une stabilisation de la forme bisulfite.

Enfin, il est apparu que le taux de biotransformation en 3SH est spécifique à chaque forme de précurseurs. En effet, plus le précurseur se situe en amont du flux métabolique, plus le nombre d'étapes réactionnelles augmente et plus le rendement est faible.

L'ensemble de ces résultats nous permet donc de compléter le schéma réactionnel d'assimilation et de biotransformation du potentiel en 3SH (Figure 58). Le raisin et le moût qui en découle renferme naturellement les formes S-conjugués du 3SH qui sont formées par la voie « végétale » des lipoxygénases libérant le *trans*-2-hexenal qui est conjugué au glutathion par une glutathion transférase (GST) formant ainsi le Pgsh3SH

qui sera clivé en S-conjugué à la cystéine par les voies de détoxication (Thibon *et al.*, 2011a). Lors des étapes pré-fermentaires, l'addition de SO₂ dans les moûts peut conduire à une combinaison bisulfite de la forme aldéhydrique du S-conjugué au glutathion (Figure 45, réaction 1). L'équilibre entre la forme libre et la forme combinée est très probablement dépendant bien évidemment de la teneur en SO₂, mais aussi de la composition du moût. Lors de la fermentation et dès la phase de latence, les levures libèrent de grande quantité d'acétaldéhyde qui possède un fort pouvoir de combinaison du SO₂ (Cheraïti *et al.*, 2010). Il est possible que la décomposition de la combinaison bisulfite du Pgsh3SH-Al observée en début de fermentation soit due à une compétition de l'éthanal présent à des concentrations de l'ordre de quelques milligrammes à plusieurs grammes par litre (Figure 45, étape 4).

Nous avons également observé que le Pgsh3SH-Al et le Pgsh3SH-SO₃ sont également assimilés par les levures. Le transport de la forme alcool (Pgsh3SH) est réalisé par le transporteur du glutathion réduit Opt1p qui est actif dès les premières heures de fermentation (Kumar *et al.*, 2003). Si Opt1p transporte le Pgsh3SH au même titre que le glutathion, il est fort probable qu'il permette également le transport du Pgsh3SH-Al. Une fois dans la cellule, le Pgsh3SH-Al peut être réduit en alcool par les enzymes de type alcool déshydrogénase fortement exprimées en début de phase exponentielle de croissance telle que Adh1p (Harsch *et al.*, 2013) conduisant à la formation du Pgsh3SH. Celui-ci semble être métabolisé selon la voie d'élimination des composés xénobiotiques générant des S-conjugués au glutathion par des enzymes de type glutathion S-transférase.

D'après nos résultats, les carboxypeptidases telles que Cpcp et Cpyp seraient à l'origine du Pglucys3SH, lui-même à l'origine du Pcys3SH par l'intervention de γ -glutamyltranspeptidases telles que Cis2p. La voie conduisant à l'intermédiaire Pcysgly3SH, proposée par Winter *et al.* n'est pas évidente dans nos conditions.

Une fois le Pcys3SH formé, la β -lyase Irc7p peut alors cliver la liaison C-S libérant ainsi le 3SH (Thibon *et al.*, 2008b ; Paz Santiago Calderon, 2014). Enfin, une partie du 3SH (généralement inférieure à 10%) peut être estérifiée en A3SH par l'enzyme Atf1p (Swiegers *et al.*, 2006 ; Paz Santiago Calderon, 2014).

La compréhension des flux métaboliques de *S. cerevisiae* conduisant au 3SH permet d'expliquer que le taux de biotransformation du Pcys3SH en 3SH soit supérieur à celui du Pgsh3SH, lui-même supérieur à celui du Pgsh3SH-Al et du Pgsh3SH-SO₃.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Les mécanismes impliqués dans la biogénèse des thiols volatils, en particulier du 3-sulfanylhexanol (3SH), responsable des notes d'agrumes dans les vins, ont fait et font toujours l'objet de nombreuses études. Récemment, certaines d'entre elles tendent à démontrer que les précurseurs du 3SH de type *S*-conjugué à la cystéine (Pcys3SH) ou au glutathion (Pgsh3SH), identifiés à ce jour, ne seraient pas les précurseurs majoritaires du 3SH dans les moûts. Les objectifs de ce travail étaient de caractériser et d'identifier l'ensemble des composés associés au potentiel en 3SH des moûts de Sauvignon blanc afin d'évaluer leur contribution respective aux teneurs en 3SH dans les vins.

La première partie de notre travail a consisté à mettre en place et à évaluer les performances de méthodes de fractionnement en vue de la purification des formes précurseurs du 3SH.

(i) Pour cela, nous avons, dans un premier temps, évalué les performances de la méthode initialement utilisée par Darriet (1993) et Tominaga (1998) pour isoler les *S*-conjugués à la cystéine des moûts par chromatographie liquide basse pression sur silice greffée en C₁₈ (SPE-C₁₈). L'optimisation de cette méthode a permis de mettre en évidence **l'existence de nouvelles formes précurseurs de 3SH**. Cependant, il est apparu que les capacités de rétention et la résolution de cette technique étaient trop limitées pour poursuivre l'identification de l'ensemble des composés précurseurs d'arômes du 3SH.

(ii) Par la suite, nous démontrons que la **chromatographie de partage centrifuge** (CPC), technique chromatographique liquide-liquide faisant abstraction d'une phase solide, présente de nombreux avantages dont une sélectivité importante indispensable à la purification des composés sous forme de trace en matrice chargée tels que les précurseurs du 3SH dans les moûts. Celle-ci demande, en revanche, une optimisation et un ajustement spécifique du système solvant utilisé. Par l'étude du coefficient de partage des formes précurseurs *S*-conjugués, nous avons sélectionné un système en

parfaite adéquation à la purification de l'ensemble des formes précurseurs du 3SH Il s'agit d'un système Butanol-eau ponté par le méthanol en proportion 36,4/10,6/53 et acidifié à pH 2,5. Cette approche originale nous a permis de confirmer, d'une part, le rôle majeur des S-conjugués dans le potentiel en 3SH des moûts, et d'autre part, de confirmer l'existence de nouvelles formes précurseurs dans un extrait de moût. Leur contribution au **potentiel en 3SH a été estimée à près de 20 %**. Cependant, l'utilisation de la CPC nécessite l'obtention préalable d'un extrait de moût.

(iii) Dans cette optique, nous avons transposé la méthode SPE-C₁₈ en **chromatographie Flash** automatisée. Ceci a permis de pallier au manque de reproductibilité et de précision de la méthode initiale. Nous démontrons que cette technique est adaptée, d'une part, à l'obtention rapide et facile d'un extrait brut de précurseurs du 3SH à partir d'un volume important de moût (5L) et, d'autre part, qu'elle permet de séparer les différentes formes précurseurs (connues comme inconnues) du 3SH contenues dans les moûts.

Dans une seconde partie de ce travail, nous nous sommes focalisés sur l'origine de la libération du 3SH dans les vins.

(i) Avant d'initier la purification et l'identification de ces "nouveaux" précurseurs du 3SH dans les moûts de Sauvignon, nous avons évalué le rôle des composés carbonylés insaturés en C₆, qui, réagissant avec un thiol tel que l'H₂S, peuvent former le 3SH. Cette voie de formation du 3SH dans les vins est une alternative actuellement proposée dans la littérature pour expliquer l'origine des thiols volatils. Nous démontrons **qu'en conditions œnologiques**, la production d'H₂S par la levure est notoirement insuffisante pour permettre une libération significative de 3SH à partir du ***trans*-2-hexenal ou du *trans*-2-hexenol**. En effet, le rendement de bioconversion de ces composés au cours de la fermentation alcoolique est de l'ordre de 0,003%. Sachant que les teneurs maximales en *trans*-2-hexenal dans un moût de Sauvignon blanc sont de l'ordre de 50 µg/L, nous estimons qu'au maximum **1 ng/L de 3SH** serait formé par cette voie dans les vins. La contribution du *trans*-2-hexenal ou du *trans*-2-hexenol et de l'H₂S à la libération du 3SH au cours de la fermentation alcoolique est donc négligeable. Le *trans*-2-hexenal et le *trans*-2-hexenol du moût ne sont donc pas de « nouveaux précurseurs » du 3SH des vins de Sauvignon.

(ii) D'autre part, **deux nouvelles formes précurseurs du 3SH**, jamais décrite dans la littérature ont pu être mises en évidence : le S-3-(hexan-1-al)-glutathion (**Pgsh3SH-Al**) et sa forme bisulfite, l'acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique (**Pgsh3SH-SO₃**). Nous démontrons **par la mise en place de méthodes de quantification** que ces composés sont présents dans les moûts à des teneurs avoisinant la dizaine voire la **centaine de µg/L**. Leur pourcentage de **biotransformation en 3SH** par la levure au cours de la **fermentation** alcoolique a été estimé à une valeur proche de **1%** pour le Pgsh3SH-Al et avoisinant **0,4%** pour le Pgsh3SH-SO₃. La biotransformation de ces composés en 3SH par les levures conduirait à une libération de **plusieurs dizaines voire quelques centaines de ng/L de 3SH** dans les vins.

(iii) Disposant d'outils analytiques adaptés, développés en première partie de ce travail, nous avons pu reprendre l'étude de la **contribution des S-conjugués** à la teneur en 3SH des vins de Sauvignon, en tenant compte de la découverte des nouveaux précurseurs rapportée ci-dessus. L'utilisation des molécules « **naturelles** » purifiées partiellement à partir du moût nous a permis de démontrer que **près de 65% du 3SH** des vins est formé à partir de ces 4 formes S-conjuguées ; Le **Pgsh3SH-Al** sous forme libre ou combinée du moût serait à l'origine de **5 à 13 % du 3SH** des vins, le Pcys3SH à l'origine de 17 à 24% et le Pgsh3SH à l'origine de 22 à 34%. Ces résultats confirment le rôle primordial des S-conjugués dans la libération de 3SH

(iv) Le suivi des précurseurs S-conjugués (Pcys3SH, Pgsh3SH et Pgsh3SH-Al) au cours de la fermentation alcoolique par *Saccharomyces cerevisiae* nous a permis de démontrer que ces composés présentent des **cinétiques d'assimilation propres** et qu'il existe un lien métabolique direct dans leur biotransformation. Nous montrons également que les quatre formes précurseurs du 3SH appartiennent à la **même voie d'assimilation**, et que le **Pcys3SH est un intermédiaire indispensable** à la biotransformation en 3SH des S-conjugués.

Les pourcentages de biotransformation de chaque précurseur en 3SH semblent être dépendants de la position du composé dans la voie métabolique de la levure.

La présence de SO₂ (20 mg/L) dans le milieu fermentaire semble induire une baisse des taux de biotransformation des précurseurs en 3SH ; d'autres expérimentations demeurent cependant indispensables pour étayer cette observation.

Les résultats obtenus dans ce travail ouvrent la voie à de nouveaux projets de recherche.

(i) Il est nécessaire de poursuivre les travaux de caractérisation des composés précurseurs du 3SH, en particulier par l'utilisation de la chromatographie de partage centrifuge développée dans ce travail. Cette technique pourrait permettre d'isoler d'autres composés potentiellement précurseurs de 3SH. Même si leur contribution est plus mineure que les formes *S*-conjuguées aujourd'hui connues, leur identification permettrait de compléter nos connaissances sur les acteurs du potentiel en 3SH des moûts. Cette étude pourra être élargie aux précurseurs des autres thiols volatils marqueurs de la typicité des vins de Sauvignon, en particulier la 4-méthyl-4-sulfanyl-pentan-2-one.

(ii) Par ailleurs, nous savons que la libération des arômes dans les vins est dépendante d'un grand nombre de paramètres physicochimiques. Certains d'entre eux ont été identifiés et étudiés telles que l'influence de la température de fermentation ou encore la teneur initiale en azote assimilable dans le moût. Il a été démontré au sein de notre unité le rôle prépondérant des flavanols (réaction d'addition de Michael des thiols volatils sur les flavanols, ces derniers agissant alors comme des pièges) et du glutathion (protecteur) sur la stabilisation des thiols volatils libérés. Il en existe très certainement d'autres qui pourraient expliquer l'absence de corrélation observée entre la teneur en précurseurs des moûts et la teneur en 3SH des vins. L'étude de la nature chimique de ces composés, leur niveau d'action ainsi que leur impact réel, associé à la teneur en piège, serait pertinente afin de qualifier au mieux le potentiel en 3SH des moûts de Sauvignon blanc et ainsi posséder des outils prédictifs complets.

(iii) Les mécanismes biologiques impliqués dans l'assimilation et la biotransformation des précurseurs nouvellement identifiés sont encore à préciser. Ceci pourrait être en partie réalisé par un suivi du contenu intracellulaire de l'assimilation des composés marqués, lors de la fermentation alcoolique. Une approche par délétion de gène candidat de la levure, en particulier au niveau des systèmes de transport,

(iv) pourrait être envisagée. Par ailleurs, une étude approfondie de l'activité C-S-lyase de la levure préciserait les mécanismes biologiques mis en jeu. Enfin le rôle des réactions d'acétylation, impliquant la formation d'A3SH, sur l'assimilation du S-conjugué aldéhydique devra être précisé.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

Adams, D.O., Liyanage, C. (1993). Glutathione increases in grape berries at the onset of ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 333-338

-B-

Barbe, J.-C, De Revel, G., Joyeux, A., Lonvaud-Funel, A., Bertrand, A. (2000). Role of carbonyl compounds in SO₂ binding phenomena in musts and wines from botrytized grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3413-3419

Barbe, J.-C, De Revel, G., Joyeux, A., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A. (2001). Role of botrytized grape micro-organisms in SO₂ binding phenomena. *Journal of Applied Microbiology*, 90(1), 34-42

Barbe, J.-C, De Revel, G., Bertrand, A. (2002). Gluconic acid, its lactones, and SO₂ binding phenomena in musts from botrytized grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6408-6412

Barbe, J.C., Pineau, B.(2008). Instrumental and sensory approaches for the characterization of compounds responsible for wine aroma. *Chemistry and Biodiversity* 5(6), 1170-1183

Bely, M., Sablayrolles, J. M., Barre, P. (1990). Description of alcoholic fermentation kinetics : its variability and significance. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41 (4), 319-324

Blanchard, L., Tominaga, T., Dubourdieu, D. (2001). Formation of furfurylthiol exhibiting a strong coffee aroma during oak barrel fermentation from furfural released by toasted staves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4833-4835

Blanchard, L., Darriet, P., Dubourdieu, D. (2004). Reactivity of 3-mercaptohexanol in red wine : Impact of oxygen, phenolic fractions, and sulfur dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 115-120

Bouchilloux, P., Darriet, P., Dubourdieu, D. (1998). Identification of a very odoriferous thiol, 2-methyl-3-furanthiol, in wines. [Identification d'un thiol fortement odorant, le 2-methyl-3-furanthiol, dans les vins]. *Vitis*, 37(4), 177-180

Brajcovich, M., Tibbits, N., Peron, G., Lund, C.M., Dykes, S. I., Kilmartin, P. A., Nicolau, L., (2005). Effect of screwcap and cork closures on SO₂ levels and aromas in Sauvignon blanc wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (26), 10006- 10011

Burroughs, L. F. (1975). Determining Free Sulfur Dioxide in Red Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 26 (1) (January 1), 25–29

-C-

- Cai, K., Xiang, Z. (2013). Identification and quantitation of glycosidically bound aroma compounds in three tobacco types by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1311, 149-156
- Capone, D. L., Sefton, M. A., Yoji, H., Jeffery, D. W. (2010). Analysis of precursors to wine odorant 3-mercaptohexan-1-ol using HPLC-MS/MS : Resolution and quantitation of diastereomers of 3-S-cysteinylhexan- 1-ol and 3-S-glutathionylhexan-1 -ol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1390-1395
- Capone, D. L., Sefton, M. A., Jeffery, D. W. (2011a). Application of a modified method for 3-mercaptohexan-1-ol determination to investigate the relationship between free thiol and related conjugates in grape juice and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4649-4658
- Capone, D. L., Pardon, K. H., Cordente, A. G., Jeffery, D. W. (2011b). Identification and quantitation of 3-S-cysteinylglycinehexan-1-ol (cysgly-3-MH) in Sauvignon blanc grape juice by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 11204-11210
- Capone, D. L., Jeffery, D. W. (2011c). Effects of transporting and processing Sauvignon blanc grapes on 3-mercaptohexan-1-ol precursor concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4659-4667
- Capone, D. L., Black, C. A., Jeffery, D. W. (2012). Effects on 3-mercaptohexan-1-ol precursor concentrations from prolonged storage of Sauvignon blanc grapes prior to crushing and pressing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(13), 3515-3523
- Cheraiti, N., Guezenec, S. (2010). Very early acetaldehyde production by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains : A new intrinsic character. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(2), 693-700
- Cheyrier, V. F., Trousdale, E. K., Singleton, V. L., Salgues, M. J., Wylde, R. (1986). Characterization of 2-S-glutathionylcaftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(2), 217-221
- Cheyrier, V., Souquet, J. M., Moûtounet, M. (1989). Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 320-324
- Choné, X., Van Leeuwen, C., Chery, P., Ribéreau-Gayon, P. (2001). Terroir influence on water status and nitrogen status of non irrigated Cabernet-Sauvignon. Vegetative development, must and wine composition (example of a Medoc top estate vineyard, Saint-Julien Area, Bordeaux). *South African Journal of Enology and Viticulture*, 22, 8-15
- Choné, X., Lavigne-Cruège, V., Tominaga, T., Van Leeuwen, C., Castagnède, C., Saucier, C., Dubourdieu, D. (2006). Effect of vine nitrogen status on grape aromatic potential: Flavor precursors (S-cysteine conjugates), glutathione and phenolic content in *vitis*

vinifera L. cv. Sauvignon blanc grape juice. Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin, 40(1), 1-6

Cinelli, G., Avino, P. (2014). Study of XAD-2 adsorbent for the enrichment of trace levels of phthalate esters in hydroalcoholic food beverages and analysis by gas chromatography coupled with flame ionization and ion-trap mass spectrometry detectors. Food Chemistry, 146, 181-187

Cordonnier, R., Bayonove, C. (1981). Etude de la phase pré-fermentaire de la vinification : extraction et formation de certains composés de l'arôme ; cas des terpénols, des aldéhydes et des alcools en C6. Connaissance de la Vigne et du Vin, 15, 269-286

Crouzet, J., Flanzy, C., Gunata, Y. Z., Pellerin, P., Sapis, J.C., (1998). Les enzymes en oenologie. In Oenologie, Fondements Scientifique et Technologiques, Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris, 362-411

-D-

Danilewicz, J. C. (2007). Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper American Journal of Enology and Viticulture, 58 (1), 53-60

Darriet, P. (1993). Recherches sur l'arôme et les précurseurs d'arôme du Sauvignon : applications technologiques. Doctorat Sciences biologiques et médicales. Université de bordeaux 2

Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J. -N, Dubourdieu, D. (1995). Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var Sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. Flavour and Fragrance Journal, 10(6), 385-392

Degenhardt, A., Knapp, H., & Winterhalter, P. (2000). Rapid isolation of malvidin 3-glucoside from red wine by high speed countercurrent chromatography (HSCCC). Vitis, 39(1), 43-44

Dubourdieu, D., Ollivier, C., Boidron, J. N. (1986). Incidences des opérations préfermentaires sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins blancs secs. Connaissance de la Vigne et du Vin, 20, 53-76

Dubourdieu, D., Lavigne-Cruège, V. (2003). Journée technique régionale, ITM Midi-Pyrénées, 55-58

Dubourdieu, D., Tominaga, T., Masneuf, I., Des Gachons, C. P., Murat, M. L. (2006). The role of yeasts in grape flavor development during fermentation: The example of Sauvignon blanc. American Journal of Enology and Viticulture, 57(1), 81-88

Du Toit, W. J., Lisjak, K., Stander, M., Prevoo, D. (2007). Using LC-MSMS To Assess Glutathione Levels in South African White Grape Juices and Wines Made with Different Levels of Oxygen. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 2765-2769

-F-

- Fedrizzi, B., Guella, G. (2012). Identification of intermediates involved in the biosynthetic pathway of 3-mercaptohexan-1-ol conjugates in yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Phytochemistry*, 77, 287-293
- Fowden, L. (1963). The chemistry and metabolism of recently isolated amino acid. *Revue of Biochemistry*, 33 173-204
- Francis, I. L., Newton, J. L. (2005). Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 114-126
- Friedman, M. (1994). Improvement in the safety of foods by SH-containing amino acids and peptides. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(1), 3-20

-G-

- Ganguli, D., Kumar, C., Bachhawat, A. K. (2007). The alternative pathway of glutathione degradation is mediated by a novel protein complex involving three new genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 175(3), 1137-1151
- Grace, M. H., Warlick, C. W., Neff, S. A., Lila, M. A. (2014). Efficient preparative isolation and identification of walnut bioactive components using high-speed counter-current chromatography and LC-ESI-IT-TOF-MS. *Food Chemistry*, 158, 229-238
- Grant-Preece, P. A., Pardon, K. H., Capone, D. L., Cordente, A. G., Sefton, M. A., Jeffery, D. W., Elsey, G. M. (2010). Synthesis of wine thiol conjugates and labeled analogues : Fermentation of the glutathione conjugate of 3-mercaptohexan-1-ol yields the corresponding cysteine conjugate and free thiol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1383-1389

-H-

- Hamilton-Kemp, T. R., Archbold, D. D. (2003). Emission patterns of wound volatile compounds following injury of ripe strawberry fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(4), 283-288
- Harsch, M. J., Benkwitz, F., Frost, A., Colonna-Ceccaldi, B., Gardner, R., Salmon, J-M (2013). New precursor of 3-mercaptohexan-1-ol in grape juice : Thiol-forming potential and kinetics during early stages of must fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(15), 3703-3713
- Hatanaka, A. (1993). The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry*, 34(5), 1201-1218
- Herbst, M., Kilmartin, P. A., Nicolau, L., (2008). Aroma stability in Sauvignon blanc wines. *The Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker* 6 (Annual Technical Issue), 66-72

Howell, K. S., Klein, M., Swiegers, J. H., Hayasaka, Y., Elsey, G. M., Fleet, G. H. De Barros Lopes, M. A. (2005). Genetic determinants of volatile-thiol release by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5420-5426

-I-

Ito, Y. (2005). Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1065(2), 145-168

-J-

Jakoby, W. B., Stevens, J., Duffel, M. W., Weisiger, R. A. (1984). The terminal enzymes of mercapturate formation and the thiomethyl shunt. *Revue Biochemistry and Toxicology*, 6, 97-115

J. Jaspers, C., Gigot, D., J. Penninckx, M. (1985). Pathways of glutathione degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*, 24(4), 703-707

Jocelyn, P. C., (1972). Biochemistry of the SH group. The occurrence, chemical properties, metabolism and biological function of thiols and disulphides. Academic Press, London, UK

-K-

Kalhorn, T. F., Page S. T. (2007). Analysis of testosterone and dihydrotestosterone from biological fluids as the oxime derivatives using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(19), 3200-3206

Kim, C. Y., Kim, J. (2007). Preparative isolation and purification of geniposide from gardenia fruits by centrifugal partition chromatography. *Phytochemical Analysis*, 18(2), 115-117

Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., & Takabayashi, J. (2005). Volatile C6-aldehydes and allo-ocimene activate defense genes and induce resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 46(7), 1093-1102

Kjaer, A. (1963). The distribution of sulfur compounds. *Chemical Plant Toxonomy*, London

Kobayashi, H., Takase, H., Kaneko, K., Tanzawa, F., Takata, R., Suzuki, S., Konno, T. (2010). Analysis of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione and s-3-(hexan-1-ol)-l-cysteine in *Vitis vinifera* l. cv. koshu for aromatic wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61(2), 176-185

Köhler, N., Wray, V., Winterhalter, P. (2008). Preparative isolation of procyanidins from grape seed extracts by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1177(1), 114-125

Kumar, C., Sharma, R., Bachhawat, A. K. (2003). Utilization of glutathione as an exogenous sulfur source is independent of γ -glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* : Evidence for an alternative glutathione degradation pathway. FEMS Microbiology Letters, 219(2), 187-194

Kushnir, M. M., Rockwood, A. L. (2006). Performance characteristics of a novel tandem mass spectrometry assay for serum testosterone. Clinical Chemistry, 52(1), 120-128

Kushnir, M. M., Blamires, T. (2011). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for androstenedione, dehydroepiandrosterone, and testosterone with pediatric and adult reference intervals. Clinical Chemistry, 57(7), 1084

-L-

Lavigne, V., Pons, A., Dubourdieu, D. (2007) Assay of glutathione in must and wines using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection Changes in concentration in dry white wines during alcoholic fermentation and aging. Journal of Chromatography, 1139 130-135

Lee, Y., Pack, T. W., Voyksner, R. D., Fang, Q. C., & Ito, Y. (1990). Application of high speed countercurrent chromatography/thermospray mass spectrometry for the analysis of bio-active triterpenoic acids from *boswellia carterii*. Journal of Liquid Chromatography, 13(12), 2389-2398

Lilly, M., Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S. (2000). Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. Applied and Environmental Microbiology, 66(2), 744-753

Lopes, P., Silva, M. A., Pons, A., Tominaga, T., Lavigne, V., Saucier, C., Darriet, P., Teissedre, P. L. Dubourdieu, D. (2009). Impact of oxygen dissolved at bottling and transmitted through closures on the composition and sensory properties of a Sauvignon blanc wine during bottle storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 10261-10270

Luisier, J. Buettner, H., Völker, S., Rausis, T., Frey, U. (2008). Quantification of cysteine S-conjugate of 3-sulfanylhexas-1-ol in must and wine of petite arvine vine by stable isotope dilution analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(9), 2883-2887

-M-

Manini, P., Andreoli, R. (2010). Evaluation of Alternate Isotope-Coded Derivatization Assay (AIDA) in the LC-MS/MS analysis of aldehydes in exhaled breath condensate. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 878(27), 2616-2622

Marullo, P., Bely, M., Masneuf-Pomarède, I., Pons, M., Aigle, M., Dubourdieu, D. (2006). Breeding strategies for combining fermentative qualities and reducing off-flavor production in a wine yeast model. FEMS Yeast Research, 6(2), 268-279

- Masneuf-Pomarède, I., Mansour, C., Murat, M.-L, Tominaga, T., Dubourdieu, D. (2006). Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon blanc wines. *International Journal of Food Microbiology*, 108(3), 385-390
- Maujean, A. (2001). The chemistry of sulphur in musts and wines. [La chimie du soufre dans les moûts et les vins]. *Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin*, 35(4), 171-194
- Mazelis, M. (1963). Demonstration and characterization of cysteine sulfoxide lyase in the *Cruciferae*. *Phytochemistry*, 2, 15-22
- Moridani, M. Y., Scobie, H., Salehi, P., O'Brien, P. J. (2001). Catechin metabolism : Glutathione conjugate formation catalyzed by tyrosinase, peroxidase, and cytochrome P450. *Chemical Research in Toxicology*, 14(7), 841-848
- Morozov, A., V., Sarkisov, A., G., Turovskii, V., B., Ilyaskin, V., I., *Fiz Khim, Zh.* (1979), 52, 1981
- Mueller, M. J. (2004). Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Current Opinion of Plant Biology*, 7(4), 441-448
- Murat, M.-L, Tominaga, T., Dubourdieu, D. (2001a). Assessing the aromatic potential of cabernet Sauvignon and merlot musts used to produce rose wine by assaying the cysteinylated precursor of 3-mercaptohexan-1-ol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5412-5417
- Murat, M.-L, Masneuf, I., Darriet, P., Lavigne, V., Tominaga, T., Dubourdieu, D. (2001b). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains on the liberation of volatile thiols in Sauvignon blanc wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 136-139
- Myung, K., Hamilton-Kemp, T. R. (2006). Biosynthesis of trans-2-hexenal in response to wounding in strawberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1442-1448

-N-

- Nikolantonaki, M. (2010a). Incidence de l'oxydation des composés phénoliques sur la composante aromatique des vins blancs. Doctorat Sciences, Technologies et Santé. Université Bordeaux II
- Nikolantonaki, M., Chichuc, I., Teissedre., P. L., Darriet, P. (2010b). Reactivity of volatile thiols with polyphenols in a wine-model medium: Impact of oxygen, iron, and sulfur dioxide. *Analytica Chimica Acta*, 660, 102-109
- Nikolantonaki, M., Darriet, P. (2011). Identification of ethyl 2-sulfanylacetate as an important off-odor compound in white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), 10191-10199

-O-

- Ollivier, C. (1987). Recherches sur la vinification des vins blancs secs. Université de Bordeaux

-P-

Paz Santiago Calderon, M. (2014). Genes involved in thiol release from cysteine and glutathione conjugates by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation, University of Auckland

Peynaud, E. (1980). Le goût du vin. Paris

Peyrot des Gachons, C. (2000a). Recherches sur le potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. Doctorat Sciences biologiques et médicales, Université Bordeaux II

Peyrot Des Gachons, C. P., Tominaga, T., Dubourdieu, D. (2000b). Measuring the aromatic potential of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc grapes by assaying S-cysteine conjugates, precursors of the volatile thiols responsible for their varietal aroma. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(8), 3387-3391

Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T., Dubourdieu, D. (2002a). Localization of S-cysteine conjugates in the berry: Effect of skin contact on aromatic potential of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc must. American Journal of Enology and Viticulture, 53(2), 144-146

Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T. (2002b). Sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form: identification of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(14), 4076-4079

Peyrot des Gachons, C., Van Leeuwen, C., Tominaga, T., Soyer, J., Gaudillère, J., Dubourdieu, D. (2005). Influence of water and nitrogen deficit on fruit ripening and aroma potential of *Vitis vinifera* L cv Sauvignon blanc in field conditions. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85(1), 73-85

Pinu, F. R., Jouanneau, S., Nicolau, L., Gardner, R. C., Villas-Boas, S. G. (2012). Concentrations of the volatile thiol 3-mercaptohexanol in Sauvignon blanc wines: No correlation with juice precursors. American Journal of Enology and Viticulture, 63(3), 407-412

-R-

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Dubourdieu, D. Maujean, A. (1998, 2004b). Traité d'oenologie. Chimie du vin. Stabilisation et traitements, Dunod Paris

Roland, A., Vialaret, J., Razungles, A., Rigou, P., Schneider, R. (2010a). Evolution of S-cysteinylated and s-glutathionylated thiol precursors during oxidation of melon B. and Sauvignon blanc musts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(7), 4406-4413

- Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., Le Guernevé, C., Cavelier, F. (2010b). Straightforward synthesis of deuterated precursors to demonstrate the biogenesis of aromatic thiols in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10684-10689
- Roland, A., Vialaret, J., Moniatte, M., Rigou, P., Razungles, A., Schneider, R. (2010c). Validation of a nanoliquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the identification and the accurate quantification by isotopic dilution of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in white grape juices. *Journal of Chromatography A*, 1217(10), 1626-1635
- Roland, A., Schneider, R., Guernevé, C. L., Razungles, A., Cavelier, F. (2010d). Identification and quantification by LC-MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: Elements for understanding the 3MH production in wine. *Food Chemistry*, 121(3), 847-855
- Roland, A. (2010e). Influence des phénomènes d'oxydation lors de l'élaboration des moûts sur la qualité aromatique des vins de Melon B. et de Sauvignon Blanc en Val de Loire. Université de Montpellier
- Roland, A., Schneider, R., Charrier, F., Cavelier, F., Rossignol, M., Razungles, A. (2011). Distribution of varietal thiol precursors in the skin and the pulp of melon B. and Sauvignon blanc grapes. *Food Chemistry*, 125(1), 139-144
- S-**
- Salgues, M., Cheynier, V., Gunata, Z., Wylde, R. (1986). Oxidation of grape juice 2-s-glutathionyl caffeoyl tartaric acid by botrytis cinerea lactase and characterization of a new substance : 2,5-di-S-glutathionyl caffeoyl tartaric acid. *Journal of Food Science*, 51(5), 1191-1194
- Scherens, B., Feller, A., Vierendeels, F., Messenguy, F., Dubois, E. (2006). Identification of direct and indirect targets of the Gln3 and Gat1 activators by transcriptional profiling in response to nitrogen availability in the short and long term. *FEMS Yeast Research*, 6(5), 777-791
- Schneider, R. (2001). Contribution à la connaissance de l'arôme et du potentiel aromatique du Melon B. (*Vitis vinifera* L.) et des vins de Muscadet
- Schneider, R., Charrier, F., Razungles, A., & Baumes, R. (2006). Evidence for an alternative biogenetic pathway leading to 3-mercaptohexanol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wines. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2 SPEC. ISS.), 58-64
- Schüttler, A. (2012). Influencing factors on aromatic typicality of wines from *Vitis vinifera* L. cv. Riesling. Thèse de doctorat des universités de Bordeaux et de Giessen

- Singleton, V. L., Salgues, M., Zaya, J., Trousdale, E. (1985) Caftaric Acid Disappearance and Conversion to Products of Enzymic Oxidation in Grape Must and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, (1), 50- 6
- Solomko, V. P., Panasyuk, V. D., Zelenskaya, A., *Prikl. Khim, M. Zh.*, (Leningrad), 35 (1962), 628
- Starkenmann, C., Troccaz, M., & Howell, K. (2008). The role of cysteine and cysteine-S conjugates as odour precursors in the flavour and fragrance industry. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(6), 369-381
- Stoll, A., Seebeck, E. (1951). Chemical investigation on alliin, The specific principle of garlic. *Advanced Enzymology*, 11 377-400
- Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J., Degryse, E. (2008a). Nitrogen catabolite repression modulates the production of aromatic thiols characteristic of Sauvignon blanc at the level of precursor transport. *FEMS Yeast Research*, 8(5), 771-780
- Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J., Degryse, E. (2008b). New insights on 3-mercaptohexanol (3MH) biogenesis in Sauvignon blanc wines: Cys-3MH and (E)-hexen-2-al are not the major precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9230-9235
- Swiegers, J. H., Pretorius, I. S. (2005). Yeast modulation of wine flavor. *Advances in Applied Microbiology*, 57, 131-175
- Swiegers, J. H., Willmott, R. (2006). Modulation of volatile thiol and ester aromas by modified wine yeast. *Developments in Food Science*, 43, 113-116
- Swiegers, J. H., Pretorius, I. S. (2007a). Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(5), 954-960
- Swiegers, J. H., Capone, D. L., Pardon, K. H., Elsey, G. M., Sefton, M. A., Francis, I. L., Pretorius, I. S. (2007b). Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma. *Yeast*, 24(7), 561-574
- Swiegers, J. H., Kievit, R. L., Siebert, T., Lattey, K. A., Bramley, B. R., Francis, I. L., Pretorius, I. S. (2009). The influence of yeast on the aroma of Sauvignon blanc wine. *Food Microbiology*, 26(2), 204-211

-T-

- Tanaka, T., Mine, C., Inoue, K., Matsuda, M. Kouno, I. (2002). Synthesis of theaflavin from epicatechin and epigallocatechin by plant homogenates and role of epicatechin quinone in the synthesis and degradation of theaflavin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2142-2148
- Ter Schure, E. G., Van Riel, N. A. W., Verrips, C. T. (2000). The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 67-83

- Thibon, C. (2006). Recherches sur les précurseurs cystéinylés de l'arôme variétal des vins de Sauvignon blanc. In Doctorat Sciences biologiques et médicales. Bordeaux : Université de Bordeaux II
- Thibon, C., Shinkaruk, S., Tominaga, T., Bennetau, B., Dubourdieu, D. (2008a). Analysis of the diastereoisomers of the cysteinylated aroma precursor of 3-sulfanylhexanol in *Vitis vinifera* grape must by gas chromatography coupled with ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1183(1-2), 150-157
- Thibon, C., Marullo, P., Claisse, O., Cullin, C., Dubourdieu, D., Tominaga, T. (2008b). Nitrogen catabolic repression controls the release of volatile thiols by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1076-1086
- Thibon, C., Dubourdieu, D., Darriet, P., Tominaga, T. (2009). Impact of noble rot on the aroma precursor of 3-sulfanylhexanol content in *Vitis vinifera* L. cv Sauvignon blanc and semillon grape juice. *Food Chemistry*, 114(4), 1359-1364
- Thibon, C., Cluzet, S., Mérillon, J. M., Darriet, P., Dubourdieu, D. (2011a). 3-slfanylhexanol precursor biogenesis in grapevine cells : The stimulating effect of *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1344-1351
- Thibon, C., Cluzet, S., Mérillon, J. M., Darriet, P., Dubourdieu, D. (2011b). Identification of biogenesis pathways of 3-sulfanylhexanol precursors in *Vitis vinifera* cells induced by *Botrytis cinerea*. *Oeno 2011*, Dunod, 100-104
- Thoma, I., Loeffler, C. (2003). Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant Journal*, 34(3), 363-375
- Tominaga, T., Masneuf, I. (1995). Mise en évidence d'un S-conjugué de la cystéine, précurseur d'arôme du Sauvignon. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 29(4), 227-232
- Tominaga, T., Darriet, P., Dubourdieu, D. (1996). Identification of 3-mercaptohexyl acetate in Sauvignon wine, a powerful aromatic compound exhibiting box-tree odor. [Identification de l'acetate de 3-mercaptohexanol, compose a forte odeur de buis, intervenant dans l'arôme des vins de Sauvignon]. *Vitis*, 35(4), 207-210
- Tominaga, T., Furrer, A., Henry, R., Dubourdieu, D. (1998a). Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(3), 159-162
- Tominaga, T., Des Gachons, C. P., Dubourdieu, D. (1998b). A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc: S-cysteine conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 5215-5219
- Tominaga, T. (1998c). Recherches sur l'arôme variétal des vins de *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc et sa genèse à partir de précurseurs inodores du raisin. In Doctorat Sciences Biologiques et Médicales. Bordeaux : Université de Bordeaux II

Tominaga, T., Guimbertau, G., Dubourdieu, D. (2003). Contribution of benzenemethanethiol to smoky aroma of certain *Vitis vinifera* L. wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(5), 1373-1376

Tominaga, T., Dubourdieu, D. (2006). A novel method for quantification of 2-methyl-3-furanthiol and 2-furanmethanethiol in wines made from *Vitis vinifera* grape varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(1), 29-33

Tominaga, T., Niclass, Y., Frérot, E., Dubourdieu, D. (2006b). Stereoisomeric distribution of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in dry and sweet white wines made from *Vitis vinifera* (var. Sauvignon blanc and semillon). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(19), 7251-7255

Toribio, A. (2007). Développement de nouvelles approches méthodologiques en Chromatographie de Partage Centrifuge en vue de la purification de molécules d'intérêt. Doctorat pharmacie, pharmacognosie. Université de Reims

Toyo'oka, T. (2012). LC-MS determination of bioactive molecules based upon stable isotope-coded derivatization method. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 69, 174-184

-U-

Ubiyvovk, V. M., Blazhenko, O. V., Gigot, D., Penninckx, M., Sibirny, A. A. (2006). Role of γ -glutamyltranspeptidase in detoxification of xenobiotics in the yeasts *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae*. Cell Biology International, 30(8), 665-671

-V-

Van Leewen, C., Seguin, G. (1994). Incidences de l'alimentation en eau de la vigne, appréciée par l'état hydrique du feuillage, sur le développement de l'appareil végétatif et la maturation du raisin. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 28, 81-110

Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D. M., Vanderhaegen, B. M. P., Derdelinckx, G., Dufour, J., Pretorius, I. S., Delvaux, F. R. (2003). Expression levels of the yeast alcohol

acetyltransferase genes ATF1, Ig-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters. Applied and Environmental Microbiology, 69(9), 5228-5237

Virtanen, A. I. (1965). Studies on organic sulfur compounds and other labile substances in plants. Phytochemistry, 4, 207-228

-W-

Wang, E., Yin, Y. (2014). Isolation of high-purity anthocyanin mixtures and monomers from blueberries using combined chromatographic techniques. Journal of Chromatography A, 1327, 39-48

- Winter, G., Van Der Westhuizen, T., Higgins, V. J., Curtin, C., Ugliano, M. (2011). Contribution of cysteine and glutathione conjugates to the formation of the volatile thiols 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) and 3-mercaptohexyl acetate (3MHA) during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17(2), 285-290
- Wolf, A. E., Dietz, K., Schröder, P. (1996). Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *FEBS Letters*, 384(1), 31-34
- Wünschmann, J., Krajewski, M. (2010). Dissection of glutathione conjugate turnover in yeast. *Phytochemistry* 71(1), 54-61
- Y-**
- Young Kim, C., Ahn, M., Kim, J. (2006). Preparative isolation of mangiferin from *anemarrhena asphodeloides* rhizomes by centrifugal partition chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 29(6), 869-875
- Y-**
- Young Kim, C., Ahn, M., Kim, J. (2006). Preparative isolation of mangiferin from *anemarrhena asphodeloides* rhizomes by centrifugal partition chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 29(6), 869-875
- Z-**
- Zhong, S., Ren, J. (2014). Free and bound volatile compounds in juice and peel of Eureka lemon. *Food Science and Technology Research*, 20(1), 167-174
- Zhou, Y., Riesen, R., Gilpin, C. S. (1996). Comparison of amberlite XAD-2/freon 11 extraction with liquid/liquid extraction for the determination of wine flavor components.

Recherches sur les précurseurs du 3-sulfanylhexanol des vins de Sauvignon blanc

La mise au point de techniques de fractionnement des moûts de Sauvignon blanc par chromatographie de partage centrifuge et par chromatographie Flash, a permis de mettre en évidence la présence de deux « nouvelles » formes précurseurs du 3SH (le S-3-(hexan-1-al)-glutathion et l'acide S-3-glutathionyl-hydroxyhexanesulfonique). L'ensemble de ces résultats a permis de confirmer la contribution majeure des S-conjugués au potentiel en 3SH des moûts. Le S-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine, le S-3-(hexan-1-ol)-glutathion ainsi que les deux nouvelles formes identifiées, permettent d'expliquer près de 65% du 3SH libéré dans les vins. Par ailleurs, nous avons montré que l'ensemble des formes précurseurs appartenait à la même voie d'assimilation de la levure et que le S-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine est un intermédiaire indispensable à la biotransformation des S-conjugués au glutathion, précurseurs du 3-sulfanylhexanol. De plus, le pourcentage de biotransformation des différents S-conjugués en 3SH semble directement lié à leur position dans le flux métabolique.

Mots-clés :

Sauvignon blanc, précurseurs d'arômes S-conjugués, biotransformation, 3-sulfanylhexanol, thiols volatils, chromatographie Flash, chromatographie de partage centrifuge

Research on 3-sulfanylhexanol precursors of Sauvignon blanc wines

The development of fractionation techniques in Sauvignon Blanc musts such as centrifugal partition chromatography and flash chromatography, permitted to identify two precursor forms of 3-sulfanylhexanol : the S-3-(hexan-1-al)-glutathione, and the S-3-glutathionyl-hydroxy hexanesulfonic acid. These results confirmed the major contribution of S-conjugates in the potential liberation of 3-sulfanylhexanol in musts. The two newly identified forms along with S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine and S-3-(hexan-1-ol)-glutathione, explain up to 65% of the total release of 3-sulfanylhexanol. Furthermore, we showed that all precursor forms belonged to the same assimilation pathway of yeast and the S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine is an essential intermediate in the metabolism of S-glutathione conjugates, which is a precursor of 3-sulfanylhexanol . Finally, the biotransformation percentage of different S-conjugates of 3-sulfanylhexanol seems directly related to their position in the metabolic flow.

Keywords :

Sauvignon blanc, flavor precursors S-conjugates, biotransformation, 3-sulfanylhexanol, volatile thiols, Flash chromatography, Centrifugal Partition Chromatography